

Einfluss von Naturstoffen auf die Funktionen der Makrophagenzelllinie RAW 264.7

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
Der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Bianca Lüderitz
aus Braunschweig

1. Referentin:	apl. Professor Dr. Ursula Marie Bilitewski
2. Referent:	Professor Dr. Ludger Beerhues
eingereicht am:	16.01.2008
mündliche Prüfung (Disputation) am:	09.04.2008
Druckjahr 2008	

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einigen Personen danken, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre:

Prof. Dr. Ursula Bilitewski danke ich für die Vergabe des interessanten Promotionsthemas und für die Möglichkeit diese Arbeit in der Abteilung Targetidentifizierung am Helmholtz Zentrum für Infektionsforschung durchführen zu können. Ihre Anregungen und Diskussionen haben die Arbeit sehr erleichtert.

Prof. Dr. Ludger Beerhues danke ich für die freundliche Übernahme des Coreferates.

Ein besonderer Dank gilt meinen Kollegen: Ulrike Bröder, Klaus Conrad, Birte Engelhardt, Bettina Hinkelmann, Diana Telkemeyer und Dr. Florenz Sasse, welche ihre Erfahrung und ihr Wissen stets bereitwillig mit mir teilten.

Großen Dank schulde ich den übrigen Doktoranden unserer Abteilung: Janine Wesolowski, Nina Klippel und Dörthe Sokolis, die nicht nur fachlich, sondern vor allem menschlich eine große Hilfe während der Arbeit gewesen sind.

Außerdem möchte ich mich ganz herzlich bei meinen beiden fleißigen Korrekturleserinnen Randi Diestel und Jessica Isermann bedanken, die trotz eigener Zeitnot, die Muße fanden meine Arbeit zu lesen.

Meiner besten Freundin Sandra Shahab-Osterloh danke ich für die vielen Kaffees, die aufbauenden Gespräche und die sachlichen Beiträgen zu fachlichen Fragen. Du bist die Beste!

Danken muss ich auch all meinen Freunden, die mich wieder auf den Boden geholt haben, wenn alles zu viel zu werden schien und mir zeigten, dass es noch mehr gibt als Arbeit.

Ganz zum Schluss gilt mein tiefer Dank meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und immer nur mein Bestes wollten. Ihr wart immer da, hörtet zu und sagtet: Du machst das schon! Danke für euer Vertrauen und eure Geduld.

**Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems,
das gelöst werden will.**

Galileo Galilei

15.02.1564 – 08.01.1642

italienischer Physiker und Astronom

Inhaltsverzeichnis

1. Aufgabenstellung und Einleitung.....	Seite 1
2. Grundlagen zum Immunsystem.....	Seite 5
2.1 Aufbau des Immunsystems höherer Organismen.....	Seite 5
2.2 Makrophagen.....	Seite 8
2.2.1 Allgemeine Funktionen.....	Seite 8
2.2.2 Phagozytose.....	Seite 11
2.2.3 Stickstoffmonoxid (NO).....	Seite 13
2.2.4 Stimulation der Makrophagen.....	Seite 14
2.2.5 Signalkaskaden der aktivierten Makrophagen.....	Seite 16
3. Material.....	Seite 20
3.1 Geräte.....	Seite 20
3.2 Chemikalien.....	Seite 22
3.3 Antikörper und rekombinantes Interleukin 6.....	Seite 25
3.4 Medien und Serum.....	Seite 25
3.4.1 Zellkulturmedium.....	Seite 25
3.4.2 KM1 Medium für <i>E.coli</i>	Seite 25
3.5 Zellkulturmaterial.....	Seite 26
3.6 Zellkulturen und Bakterien-Stämme.....	Seite 26
3.7 ELISA Kit Systeme.....	Seite 27
3.8 IPG-Streifen für zweidimensionale Gelelektrophorese.....	Seite 27
3.9 Puffer und Lösungen.....	Seite 27
3.9.1 PBS Puffer.....	Seite 27
3.9.2 Beschichtungspuffer (50 mM).....	Seite 27
3.9.3 Natriumacetatpuffer (100 mM) und Farbreagenz.....	Seite 27
3.9.4 BSA-Stammlösung (2%ig) zum Blocken.....	Seite 28
3.9.5 Lysepuffer für Makrophagen.....	Seite 28
3.9.6 Griess Reagenz.....	Seite 28
3.9.7 Acrylamidlösung für zweidimensionale Gelelektrophorese.....	Seite 29
3.9.8 Ausgleichslösung für zweidimensionale Gelelektrophorese.....	Seite 29

3.9.9 Equilibrierungspuffer für die zweidimensionale Gelelektrophorese.....	Seite 29
3.9.10 Lagerpuffer für zweidimensionale Gele.....	Seite 29
3.9.11 1,5 %ige Agarose-Lösung zur Fixierung der IPG-Streifen.....	Seite 30
3.9.12 Fixierlösung für die zweidimensionalen Gele.....	Seite 30
3.9.13 Coomassie Brilliant Blue Färbung.....	Seite 30
4. Methoden.....	Seite 31
4.1 Bestimmung der Zellzahl.....	Seite 31
4.2 Zellkultivierung und Kryokonservierung der Zelllinie bzw. der Bakterien.....	Seite 32
4.3 Lyse der Zellen.....	Seite 33
4.4 Proteinbestimmung des Lysats.....	Seite 33
4.5 CFSE-Färbung von <i>E.coli</i>	Seite 33
4.6 Einfluss der Substanzen auf die Zellvitalität (WST-Test).....	Seite 34
4.7 Phagozytose-Assay.....	Seite 36
4.8 Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA).....	Seite 37
4.8.1 TNF- α ELISA.....	Seite 39
4.8.2 Interleukin 6 ELISA.....	Seite 39
4.9 Indirekter Nachweis von Stickstoffmonoxid mit Hilfe der Griess-Reaktion.....	Seite 41
4.10 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	Seite 41
4.10.1 Herstellung der SDS-Gele für die zweidimensionale Gelelektrophorese.....	Seite 43
4.10.2 Passive Rehydrierung.....	Seite 44
4.10.3 Isoelektrische Fokussierung.....	Seite 45
4.10.4 Equilibrierung der IPG-Streifen.....	Seite 45
4.10.5 Zweite Dimension der 2D-Gelelektrophorese.....	Seite 46
4.10.6 Fixierung und Färbung der 2D-Gele.....	Seite 47
5. Ergebnisse.....	Seite 48
5.1 Wachstumskurve.....	Seite 48
5.2 Einfluss auf das Wachstum der Zelllinie RAW 264.7.....	Seite 52
5.3 Nachweis von Stickstoffmonoxid als Mediator der Immunantwort.....	Seite 57

5.3.1 Nachweis von NO nach Stimulation der Zellen.....	Seite 58
5.3.2 Konzentrationsabhängigkeit der Stickstoffmonoxid- bildung nach Stimulation.....	Seite 58
5.3.3 Zeitabhängigkeit der Stickstoffmonoxidbildung.....	Seite 59
5.3.4 Kombination der Substanzen mit LPS.....	Seite 60
5.4 Nachweis von TNF- α nach Stimulation der Zellen.....	Seite 64
5.4.1 Stimulation der Zellen mit verschiedenen Substanzen.....	Seite 64
5.4.2 Einfluss der Konzentration auf die TNF- α Bildung.....	Seite 65
5.4.3 Zeitabhängigkeit der TNF- α Bildung.....	Seite 66
5.5 Nachweis des Cytokins Interleukin 6 (IL 6).....	Seite 69
5.5.1 Inkubation der Zellen mit verschiedenen Naturstoffen.....	Seite 69
5.5.2 Zeitabhängiger Anstieg der IL-6 Produktion nach Stimulation mit Tubulysin A.....	Seite 70
5.6 Einfluss auf die Phagozytose.....	Seite 71
5.6.1 Zeitlicher Verlauf der Phagozytose von <i>E.coli</i> -Zellen.....	Seite 71
5.6.2 Einfluss der Substanzen auf die Phagozytose.....	Seite 72
5.6.3 Mikroskopische Betrachtung der Phagozytose.....	Seite 75
5.7 Zweidimensionale Gelelektrophorese.....	Seite 77
6. Diskussion.....	Seite 81
6.1 Kultivierung und mikroskopische Betrachtung der Zelllinie RAW 264.7.....	Seite 83
6.2 Untersuchungen zur Toxizität der verwendeten Substanzen.....	Seite 85
6.3 Einfluss der Substanzen auf die Produktion von Stickstoffmonoxid.....	Seite 86
6.4 Einfluss der Substanzen auf die Sekretion der Cytokine.....	Seite 87
6.5 Einfluss der Substanzen auf die Phagozytose.....	Seite 89
6.6 Analyse der Proteine der behandelten Zellen.....	Seite 91
7. Zusammenfassung.....	Seite 95
8. Ausblick.....	Seite 97
9. Abbildungsverzeichnis.....	Seite 99
10. Tabellenverzeichnis.....	Seite 102
11. Abkürzungsverzeichnis.....	Seite 103
12. Literaturverzeichnis.....	Seite 105

1. Aufgabenstellung und Einleitung

Die Untersuchung von Naturstoffen beschränkte sich in der Vergangenheit auf die Suche nach neuen Antibiotika und neuen Fungiziden sowie der Entdeckung von möglichen Krebstherapeutika [2]. Die Wirkung auf das Immunsystem eines Organismus war dabei in der Regel nicht Schwerpunkt einer Untersuchung. In dieser Arbeit wurden Makrophagen, als Zielzellen für Naturstoffe verwendet, um zu testen ob diese Substanzen, neben ihren bekannten Wirkungen, einen Einfluss auf die Funktionen der Makrophagen besitzen. Über die Wirkung der verwendeten Naturstoffe war zu Beginn der Doktorarbeit lediglich bekannt, dass sie auf das Cytoskelett von eukaryotischen Zellen wirken, indem sie die Mikrotubuli stabilisieren bzw. destabilisieren (mit Ausnahme des Vioprolids, dessen Target bislang unbekannt ist), und dass sie gegenüber den eukaryotischen Zellen eine hohe Toxizität aufweisen [7][10-13][64-65][71]. Die Substanzen sollten auf eine mögliche Verwendbarkeit zur Stimulation oder Suppression des Immunsystems getestet werden. Anhand verschiedener Tests sollte versucht werden Rückschlüsse auf die molekularen Targets der verwendeten Substanzen zu ziehen. Die Untersuchungen zielten dabei auf die Funktionsanalyse der Makrophagen wie die Sekretion von Cytokinen und Stickstoffmonoxid und die Phagozytoseaktivität, jeweils nach Inkubation der Zellen mit den vorliegenden Naturstoffen. Naturstoffe sind dabei als Substanzen definiert, die aus Tieren (z.B. der aus marinen Schwämmen isolierte Anti-Tumor Wirkstoff Pederin [52] oder das aus dem Gift der Kegelschnecken entwickelte Schmerzmittel Ziconotid [53]), Pflanzen oder Mikroorganismen stammen und dort meist als Sekundärmetabolite, d.h. unabhängig vom lebensnotwendigen Stoffkreislauf der Organismen, produziert werden. Dabei treten die verschiedensten Substanzklassen auf, z.B. Peptidderivate, Alkaloide oder Polysaccharide. Die Wirkungen dieser Stoffe unterscheiden sich sehr stark und reichen von toxischen bis zu wachstumsfördernden Funktionen. Durch chemische oder gentechnische Veränderung der Strukturen lassen sich aus den ursprünglichen Stoffen neue, wirksame Arzneimittel oder Pflanzenschutz-Wirkstoffe entwickeln [2]. Dabei wird vielfach auf die Produktion in der Fermentation zurückgegriffen, da es oft nicht möglich ist die Naturstoffe synthetisch in ausreichender Menge herzustellen. Die in der Arbeit untersuchten Substanzen Disorazol, Epothilon, Tubulysin und Vioprolid stammen aus folgenden Myxobakterien: *Sorangium cellulosum* Stamm So ce 12, *Sorangium cellulosum* Stamm So ce 90, *Archangium gephyra* Ar315 und *Cystobacter violaceus*. Disorazol zeigt eine stark hemmende Wirkung gegen

filamentöse Pilze, aber nicht gegen Hefen und Bakterien [13]. Allerdings sind sie auch sehr toxisch gegenüber tierischen Zellen, was einen Einsatz als Antimykotika unmöglich macht.

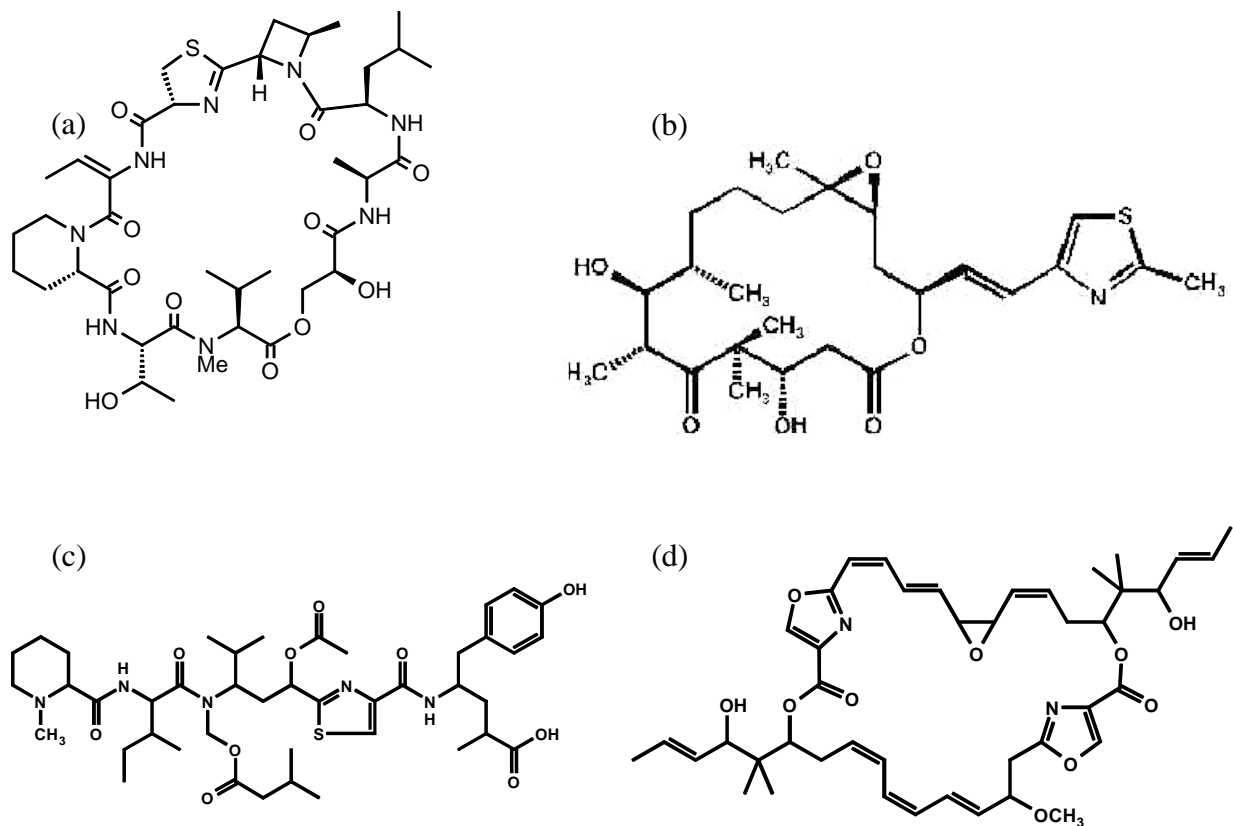


Abb. 1: (a) Chemische Struktur von Vioprolid A, (b) chemische Struktur von Epothilon B, (c) chemische Struktur von Tubulysin A, (d) chemische Struktur von Disorazol A

Auch Epothilon zeigt eine fungizide Wirkung gegenüber pflanzenpathogenen Pilzen, und weist eine hohe Toxizität gegenüber tierischen Zellen auf. Außerdem wird angenommen, dass Epothilon über immunsuppressive Eigenschaften verfügt [12]. Zusätzlich dazu ist bekannt, dass Disorazol, Epothilon und Tubulysin auf die Mikrotubuli (Abb. 2) von eukaryotischen Zellen wirken, auch wenn ihre Wirkungen dabei zum Teil entgegengesetzt sind [10-13]. Disorazol und Tubulysin wirken destabilisierend auf die Mikrotubulifilamente, während Epothilon diese Strukturen des Cytoskellets stabilisiert. Der erzeugte Effekt allerdings ist bei den verschiedenen Substanzen derselbe, die behandelten Zellen sind nicht mehr in der Lage sich zu teilen, sterben ab und werden vom Immunsystem des Körpers abgebaut. Innerhalb der Zellen findet der Transport von Vesikeln entlang der Mikrotubuli statt. Die Mikrotubuli sind sehr dynamische Strukturen, die einem ständigen Auf- und Abbau unterliegen und unter anderem für den Transport der Phagosomen zu den Lysosomen verantwortlich sind [15].

Dadurch ermöglichen sie die Verschmelzung der Vesikel und den Abbau der enthaltenen Stoffe [12].

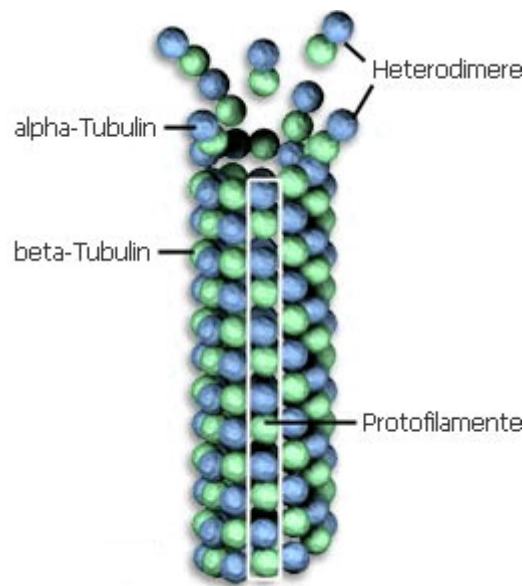


Abb. 2: Schematische Darstellung eines Mikrotubulifilaments [45]

Bei den Myxobakterien, aus denen die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen stammen, handelt es sich um Mikroorganismen, welche sich durch Gleiten fortbewegen können [2]. Diese obligat aeroben, etwa 3-12 μM großen Bakterien ernähren sich von zerfallendem Pflanzenmaterial, Dung von Pflanzenfressern und anderen organischen Zerfallsprodukten [8][7]. Durch Sekretion von Exoenzymen werden die umgebenden organischen Nährstoffquellen verdaut und können dann in ihren Bestandteilen von den Bakterien aufgenommen und verarbeitet werden [2]. Dabei werden auch andere Zellen, z.B. Hefen und andere Bakterien, zerstört und deren Überreste aufgenommen. Als Besonderheit sind die Myxobakterien der Gattung *Sorangium* zu nennen, die in der Lage sind, auch Cellulose als Nährstoffquelle zu nutzen [8]. Bei Nährstoffmangel bilden die Myxobakterien Fruchtkörper und Dauerformen, die sogenannten Myxosporen. Dies ist möglich, da die Organismen über ein hochentwickeltes Kommunikationssystem verfügen, welches die Bildung dieser besonderen Kolonieform ermöglicht [7]. Die entstehenden Fruchtkörper unterscheiden sich dabei von Gattung zu Gattung und machen eine Identifizierung der Bakterien möglich. Aus Myxobakterien lässt sich eine Vielzahl von Sekundärmetaboliten mit unterschiedlichsten Eigenschaften isolieren [8]. Dabei stellen die unterschiedlichen Bakterienstämme meist mehrere verschiedene Stoffe her. Beispiele dafür sind die gegen Hefen und Pilze eingesetzten Stoffe Ambruticin S [51] und Myxothiazol [54], das gegen phytopathogene Pilze wirkende Radjadon und das in der

Markteinführungsphase befindliche Krebstherapeutikum Epothilon [7]. Die von den Myxobakterien produzierten Sekundärmetabolite oder Naturstoffe werden mit Hilfe von Absorbern isoliert, die sich während des Wachstums im Medium der Bakterien befinden. Diese werden nach der Kultivierung mit Lösemittel behandelt um die Substanzen so wieder löslich zu machen. Bei dieser Art der Gewinnung lassen sich allerdings in der Regel nur kleinere Mengen an Substanz gewinnen, was den Einsatz von Versuchen im Mikromaßstab erforderlich macht. Die durchgeführten Versuche und erzielten Ergebnisse sollen unter Punkt 4 und 5 genauer dargestellt werden.

2. Grundlagen zum Immunsystem

2.1 Aufbau des Immunsystems höherer Organismen

Pathogene Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze und eukaryotische Parasiten), aber auch körpereigene entartete oder abgestorbene Zellen bedrohen ständig die Gesundheit vielzelliger Organismen. Als Antwort auf das Auftreten dieser Strukturen hat sich im Laufe der Evolution in vielzelligen Organismen ein System entwickelt, das gezielt gegen eindringende Mikroorganismen und körpereigene schädliche Zellen vorgeht: das, nach dem lateinischen Wort *immunis* für frei, verschont bzw. unberührt, benannte **Immunsystem**.

Das Immunsystem höherer Organismen wird grob in zwei Bereiche unterteilt: das angeborene und das erworbene (adaptive) Immunsystem. Das angeborene Immunsystem hat sich sehr früh in der Evolutionsgeschichte entwickelt und ist deswegen in allen höheren Organismen (Pflanzen, Tieren und Menschen), aber auch in einfachen Organismen wie der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* anzutreffen. Das komplexe, erworbene Immunsystem hingegen tritt nur bei Wirbeltieren auf. Die beiden Bereiche des Immunsystems unterscheiden sich in Spezifität, den beteiligten Zelltypen und der Geschwindigkeit der Reaktion auf einen eindringenden Mikroorganismus. Als erste Abwehrbarriere treten die Haut und die Schleimhäute auf. Gemeinsam mit den ständig im Blut und den Geweben zirkulierenden Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen und dendritischen Zellen gehören sie zum angeborenen Immunsystem, das schon zum Zeitpunkt der Geburt im Organismus vorhanden ist. Die Haut bzw. die Schleimhäute stellen einen mechanischen Schutz des Organismus dar, der allerdings durch Verletzungen umgangen werden kann. Gelingt es Mikroorganismen in den Wirtsorganismus einzudringen, werden sie dort von Rezeptoren auf der Oberfläche der oben genannten Zellen erkannt. Dabei sind die Rezeptoren auf Oberflächenstrukturen der Mikroorganismen spezialisiert, die für diese essentiell sind, deswegen nicht mutiert vorliegen und nicht in wirtseigenen Zellen vorkommen. Die Mikroorganismen werden durch Phagozytose aufgenommen und von Makrophagen und dendritischen Zellen abgebaut, oder durch ausgeschüttete chemische Substanzen außerhalb der Zelle zerstört. Bruchstücke der Antigene werden an der Zelloberfläche platziert und anderen Zellen des Immunsystems, z.B. den Lymphozyten, präsentiert, um diese zu aktivieren. Zusätzlich zu dieser Antigenpräsentation werden Botenstoffe ausgeschüttet, welche zur Regulation der Immunantwort verwendet werden. In Abbildung 3 sind die Verknüpfungen der verschiedenen Zelltypen und deren Aufgaben in der Immunantwort vereinfacht dargestellt.

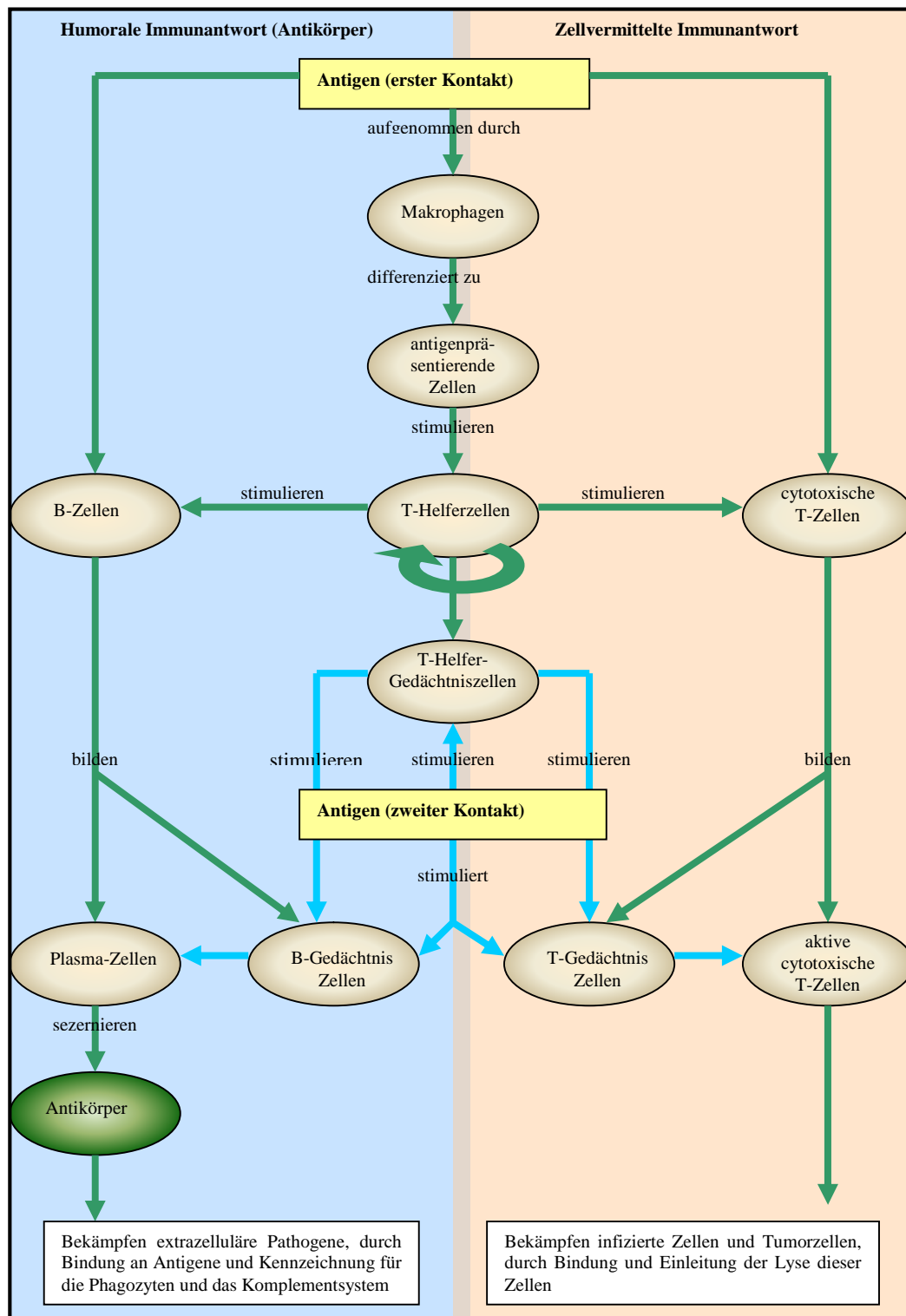


Abb. 3: Vereinfachte Darstellung der Immunantworten (grüne Pfeile: primäre Immunantwort, blaue Pfeile: sekundäre Immunantwort) [29]

Es existieren Botenstoffe, welche über die Bindung an Rezeptoren auf der Oberfläche der Zielzellen zu einer Aktivierung oder Hemmung dieser Zellen führen können. Dabei handelt es sich um die so genannten Cytokine, wie Interleukin 6 (IL-6) und Interleukin 10 (IL-10) [21]. Andere Botenstoffe, die so genannten Chemokine, leiten ihre Zielzellen via Chemotaxis

entlang von Chemokingradienten zu den Infektionsherden und sorgen für eine Reifung der Immunzellen, z.B. zu dendritischen Zellen [22]. Zu diesen Substanzen gehört z.B. das Macrophage inflammatory Protein 1 (MIP-1). Neben diesen Botenstoffen werden, unter anderem von Makrophagen, auch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffradikale sezerniert, die eine direkte schädigende Wirkung auf die Mikroorganismen besitzen.

Die abgegebenen Stoffe wirken als Vermittler zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem, z.B. zwischen Makrophagen, von denen sie gebildet werden, und T- bzw. B-Lymphozyten, welche Rezeptoren für diese Cytokine besitzen. Als Reaktion auf die Bindung der Cytokine an diese Rezeptoren kommt es zur Aktivierung der Zielzellen, welche im Fall der B-Lymphozyten zur Produktion von Antikörpern gegen das Antigen führt. Dadurch kommt es zu einer genauen Spezifizierung der Infektion durch das erworbene Immunsystem, da hierbei nicht nur allgemeine Oberflächenstrukturen, sondern speziesspezifische Strukturen erkannt werden. So kann die Bekämpfung gezielt gegen den tatsächlich eingedrungenen Organismus vorgenommen werden. Das erworbene Immunsystem besitzt zusätzlich so genannte Gedächtniszellen, die einen einmal eingedrungenen Erreger mittels der oben erwähnten Antikörper immer wieder erkennen und die Reaktion auf eine erneute Infektion beschleunigen [1].

2.2 Makrophagen

2.2.1 Allgemeine Funktionen

Makrophagen, auch „Fresszellen“ genannt, sind 10-15µM große Zellen. Sie gehören zu den Leukozyten, machen dort etwa 5-8% aller Zellen aus und werden aus einer gemeinsamen Vorläuferzelle (myeloide Vorläuferzelle) gebildet. Aus diesem Vorläufer entstehen auch die Granulozyten, Mastzellen und dendritischen Zellen. Die Makrophagenvorläufer wandern als Monocyten aus dem Knochenmark ins Blut, gelangen von dort in die Gewebe, wo sie zu gewebspezifischen Makrophagen differenzieren und einige Tage überlebensfähig sind. Diese Reifung der Blutzellen zu spezialisierten Zellen wird Hämatopoese (Abb. 4) genannt. Neben den Makrophagen und den oben erwähnten Zelltypen, werden bei diesem Vorgang auch die anderen Zellen des Immunsystems, wie Lymphozyten und Plasma-Zellen, gebildet.

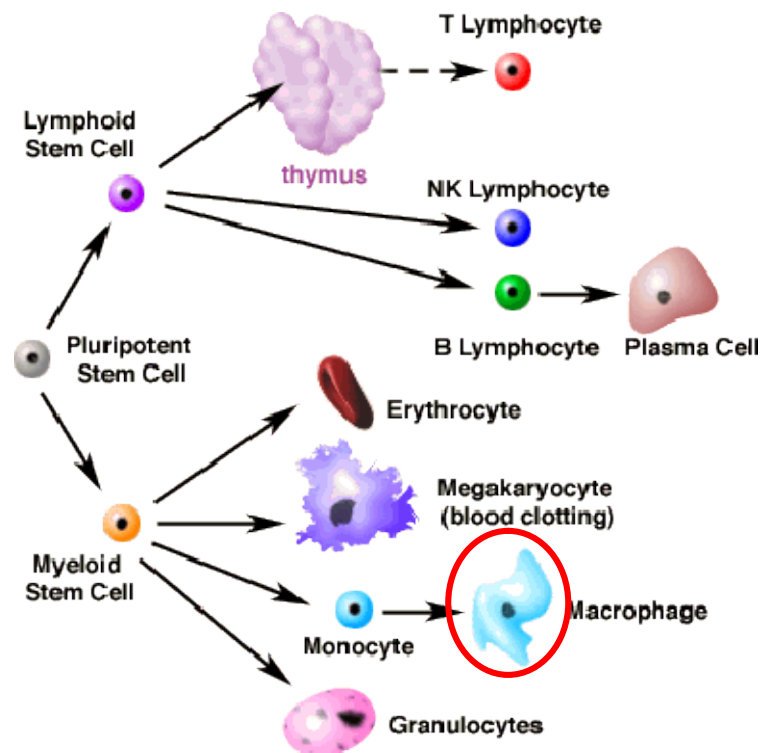


Abb. 4: Schematische Darstellung der Hämatopoese [30]

Die gewebespezifischen Makrophagen existieren in nahezu allen Geweben und Organen; so bestehen z.B. Alveolar-Makrophagen in der Lunge, Kupffer-Zellen in der Leber und Mikroglia im Gehirn. In den Geweben patrouillieren die Zellen, nehmen alle Fremdstoffe durch Phagozytose auf (Kap. 2.2.2) und bauen sie in speziellen Vesikeln, den Lysosomen ab. Die Makrophagen besitzen einige hundert Lysosomen [34], welche spaltende Enzyme, z.B. Hydrolasen, Proteasen und Nukleasen [29] enthalten und für den Abbau von in den Makrophagen aufgenommenen Partikeln (z.B. Bakterien) wichtig sind. Der Innenraum der

Lysosomen ist mit einem pH-Wert von 4,5-5,0 im Verhältnis zum umgebenden Cytosol stark sauer. Die enthaltenen Enzyme besitzen hier ihr pH-Optimum und sind bei neutralem pH-Wert kaum aktiv, was die Zelle vor einer Selbstverdauung schützt [34]. Die in den Lysosomen zerlegten Antigene werden an der Oberfläche der Zellen präsentiert und regen so andere Zellen des Immunsystems zur Aktivität an. Im Gegensatz zu den dendritischen Zellen ist dies jedoch nicht die Hauptaufgabe der Makrophagen. Sie sind vielmehr darauf spezialisiert Mikroorganismen und andere Partikel durch Aufnahme und Abbau unschädlich zu machen. Dabei wird die Bindung der Partikel an die Membran der Phagozyten auf verschiedene Arten vermittelt, zum einen durch nicht-spezifische Bindungen, wie van-der-Waals-Kräfte, und zum anderen durch spezifische Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen [6]. Die Phagozytose ist bei der rezeptorvermittelten Bindung effektiver als bei der unspezifischen Bindung. Die Erkennung der mikrobiellen Fremdkörper erfolgt dabei über so genannte Pathogen assoziierte molekulare Muster (engl. PAMPs), die nur in Mikroorganismen, jedoch nicht in höheren Zellen vorkommen (vergleiche 2.1 Immunsystem höherer Organismen) [1][4]. Somit wird eine versehentliche Zerstörung körpereigener Zellen verhindert.

Tabelle 1: Übersicht über die Funktionen der Makrophagen [41]

Auslösung der Immunantwort	<ul style="list-style-type: none"> • Antigenpräsentation • Produktion von Wachstumsfaktoren
Regulation der Immunantwort	<ul style="list-style-type: none"> • Produktion von Lymphokinen • Suppression der Immunantwort
Infektabwehr	<ul style="list-style-type: none"> • Phagozytose • Intra- und extrazelluläres Abtöten von Bakterien und Parasiten
Tumorabwehr	<ul style="list-style-type: none"> • Zellvermittelte Cytotoxizität • Produktion des Tumornekrosefaktors
Synthese verschiedener Proteine und Enzyme	<ul style="list-style-type: none"> • Komplementproteine • Gerinnungsproteine
Synthese von entzündungs- und immun-regulatorischen Mediatoren	<ul style="list-style-type: none"> • Prostaglandine • Interferone • Cytokine

Zusätzlich zur Aufnahme und dem Abbau der Fremdkörper geben die Makrophagen lösliche Faktoren nach außen ab, z.B. Stickstoffmonoxid (NO) und Sauerstoffradikalen, die zur

Stimulierung anderer Zellen des Immunsystems oder zur direkten Abwehr von Mikroorganismen verwendet werden [18]. Die Aktivierung der Makrophagen erfolgt auch durch Kontakt mit verschiedenen Lymphokinen, die von anderen Zellen des Immunsystems gebildet werden, bzw. durch Kontakt zu bakteriellen Komponenten wie die Lipopolysaccharide von gram-negativen Bakterien. Makrophagen sind ebenfalls für den Abbau von abgestorbenen (apoptotischen) körpereigenen Zellen zuständig. Dabei erfolgt die Erkennung dieser Zellen ebenfalls über die Rezeptoren, welche die Phagozytose vermitteln, da von den Zellen Strukturen präsentiert werden, welche den Oberflächenstrukturen von Mikroorganismen ähneln [19]. Die Rezeptoren können sowohl in der Zellmembran, in intrazellulären Kompartimenten oder als sekretorische Proteine vorliegen und nach außen abgegeben werden. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Opsonisierung (Markierung der Partikel), der Aktivierung des Komplementsystems, der Vermittlung der Phagozytose und der Einleitung der Apoptose [27]. Eine Möglichkeit die Aktivierung der phagocytotischen Zellen zu zeigen ist der Nachweis von Cytokinen mit Hilfe von spezifischen Antikörpern.

Bei den Cytokinen handelt es sich um Polypeptide, die von bestimmten Zellen des Immunsystems, besonders den Makrophagen, sekretiert werden und in der Lage sind, Zielzellen z.B. T-Lymphozyten zu aktivieren oder zu inhibieren (Abb. 5) [3]. Es existieren verschiedene Unterklassen der Cytokine: Interferone, Interleukine, Kolonie-stimulierenden Faktoren, Lymphokine und verschiedene Wachstumsfaktoren. Dabei sind die cytokin-produzierenden Zellen meist in der Lage mehr als ein Cytokin zu produzieren.

Makrophagen sekretieren neben anderen Cytokinen verschiedene Interleukine, darunter Interleukin 6 (IL-6), welches zur Proliferation und Differenzierung von T- und B-Lymphozyten benötigt wird, und den Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), welcher bei der lokalen Entzündungsreaktion eine Rolle spielt. Die Zielzelle wird durch Binden des Cytokins an spezielle Rezeptoren aktiviert. Nach Binden an den Rezeptor wird eine Signalkaskade gestartet, die in der Expression bestimmter Proteine endet. Die produzierenden Zellen besitzen oft ebenfalls Rezeptoren für die gebildeten Cytokine, was zum Teil mit einer Rückkopplungsreaktion zu erklären ist. Da die Cytokine als Reaktion auf eine mikrobielle Stimulation der Makrophagen nach Aktivierung bestimmter Signalkaskaden gebildet werden, kann man durch den Nachweis der Cytokine mit Hilfe von Antikörpern Rückschlüsse auf die Reaktionen in der Zelle ziehen [2].

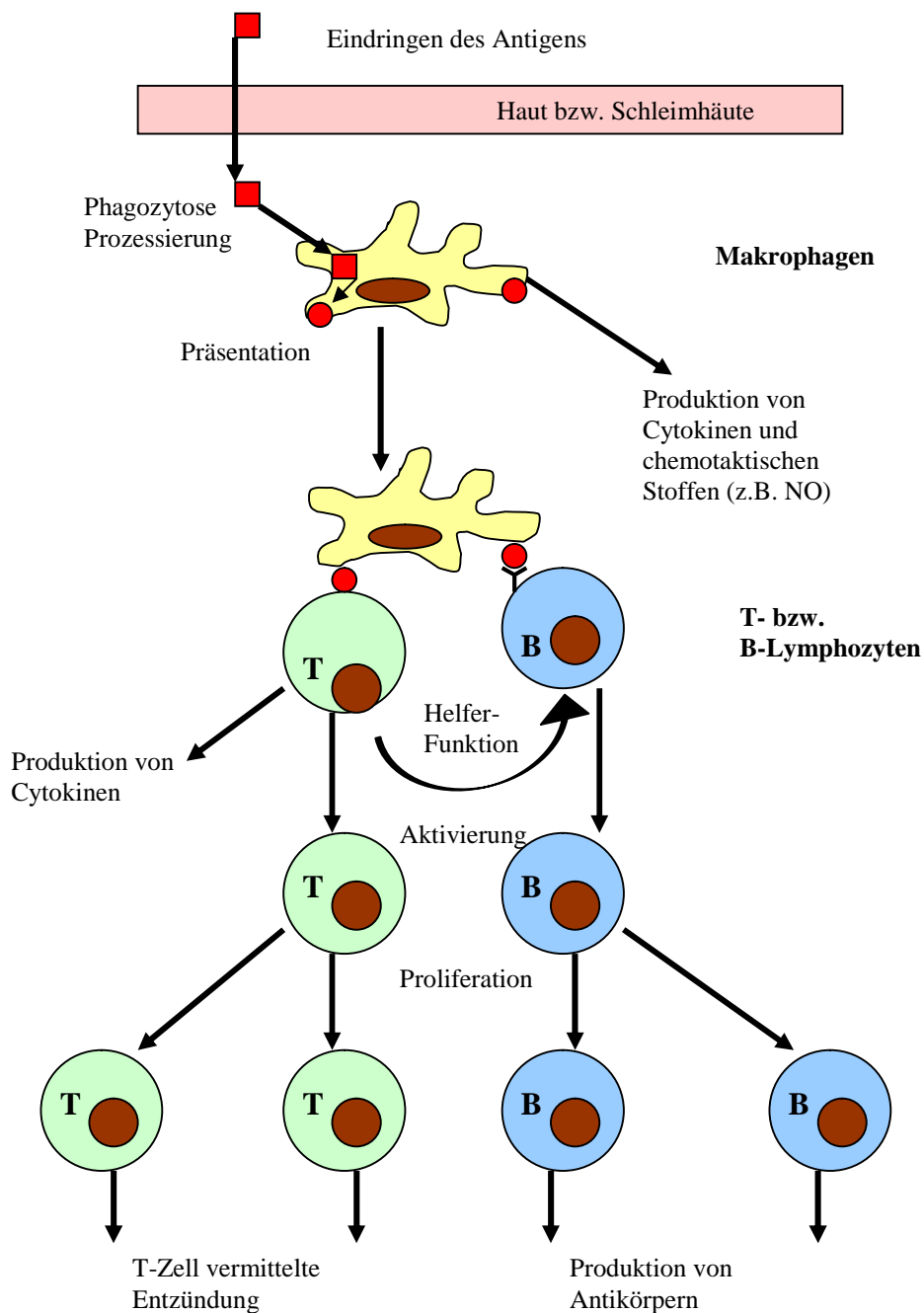


Abb. 5: Schematische Darstellung der Interaktion zwischen aktivierten Makrophagen und anderen Zellen des Immunsystems [36]

2.2.2 Phagozytose

Als Phagozytose wird der Vorgang beschrieben, bei dem feste Partikel von einer Zelle erkannt und aufgenommen werden. Im Gegensatz dazu wird die Aufnahme von flüssigem Material als Pinocytose bezeichnet. Die Zellen, die zu dieser Art der Aufnahme fähig sind, werden Phagozyten genannt. Im Immunsystem höherer Organismen gehören Makrophagen und dendritische Zellen zu den wichtigsten Vertretern der Phagozyten. Makrophagen tragen in ihrer Zellmembran Rezeptoren, die mikrobiellen Strukturen (PAMPs) und

Antikörperfragmente erkennen können, welche von aktivierten B-Lymphozyten stammen, die eingedrungene Pathogene erkannt und Antikörper gegen die Antigene produziert haben [1][2]. Die Rezeptoren binden die PAMPs bzw. Antikörper und die Zellmembran des Phagozyten beginnt sich um die Partikel auszustülpen. Das so entstehende Vesikel wird Phagosom genannt. Es wandert durch das Cytoplasma des Phagozyten und verschmilzt dort mit den primären Lysosomen zu Phagolysosomen bzw. sekundären Lysosomen (Abb. 6) [3]. Die durch Endocytose aufgenommenen Stoffe aus der Umgebung der Zellen werden in den Endosomen ebenfalls zum Lysosom transportiert und dort zerlegt. Auch in der Zelle nicht mehr benötigte oder veraltete Bestandteile, z.B. gealterte Mitochondrien, werden während der AutoPhagozytose zu den Lysosomen befördert und abgebaut.

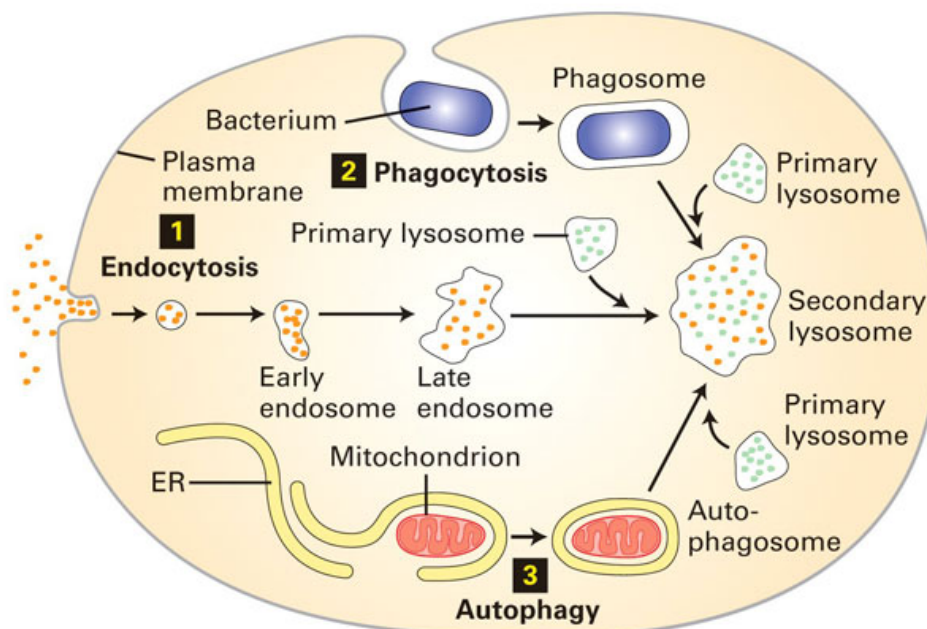


Abb. 6: Schematische Darstellung der Aufnahme und des Abbaus von Partikeln in eine Zelle [35]

Verwendbare Stoffe wie Aminosäuren gehen in den Stoffkreislauf ein, alle unverdaulichen Stoffe werden wieder aus dem Phagozyten ausgeschleust. Teile der Antigene werden an der Zelloberfläche präsentiert und dienen beispielsweise der Aktivierung von T-Lymphozyten. Die Phagozytose ist effektiver, wenn die körperfremden Partikel von Antikörpern oder Teilen des Komplementsystems umgeben sind [9]. Dieser Vorgang wird Opsonisierung genannt und erleichtert den Phagozyten das Erkennen fremden Materials [6]. Die Fähigkeit der Makrophagen zur Aufnahme von Partikeln wird im Phagozytose-Assay (Kap. 4.7) genutzt. Parallel zur Phagozytose werden auch kleine, reaktive Moleküle ausgeschüttet, z.B. Wasserstoffperoxid (H_2O_2), das Superoxidanion (O_2^-) oder Stickstoff-monoxid (NO), die

ebenfalls eine mikrobiozide Wirkung haben. Diese Reaktion ist allerdings unspezifisch, wirkt auch auf die Wirtszellen und kann diese beschädigen [1].

2.2.3 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kleines, gasförmiges Molekül, welches aus je einem Atom Sauerstoff und Stickstoff besteht. Es wird von der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) gebildet, von der insgesamt drei verschiedene Isoformen existieren: die endotheliale (eNOS), die neuronale (nNOS) und die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS). Die beiden erstgenannten sind konstitutiv exprimierte Enzyme, deren Aktivität durch steigenden oder fallenden Calciumspiegel in den Zellen reguliert wird. Die iNOS hingegen wird erst exprimiert, wenn eine Reihe von Transkriptionsfaktoren am Ende verschiedener Signalkaskaden das iNOS-Gen aktiviert hat. Sie ist calciumunabhängig und wird von Makrophagen als Antwort auf eine bakterielle Infektion gebildet. In der enzymatischen Reaktion der iNOS wird L-Arginin zu L-Citrullin reduziert und NO entsteht als Nebenprodukt (Abb. 7). Das gebildete NO wird nun als Botenstoff für andere Zellen des Immunsystems, aber auch als direkte Waffe gegen die Bakterien eingesetzt. Das NO^\bullet reagiert dabei mit dem Superoxid-Anion ($\text{O}_2^{\bullet-}$) zu Peroxynitrit ONOO^- , welches die Bakterienzellwand zerstört. Eine übermäßige Produktion von NO kann allerdings auch für den Wirt schwerwiegende Folgen haben, da auch die Zellmembran der Wirtszellen angegriffen wird. Die schweren Schäden, die dabei auftreten, können bis zum septischen Schock führen.

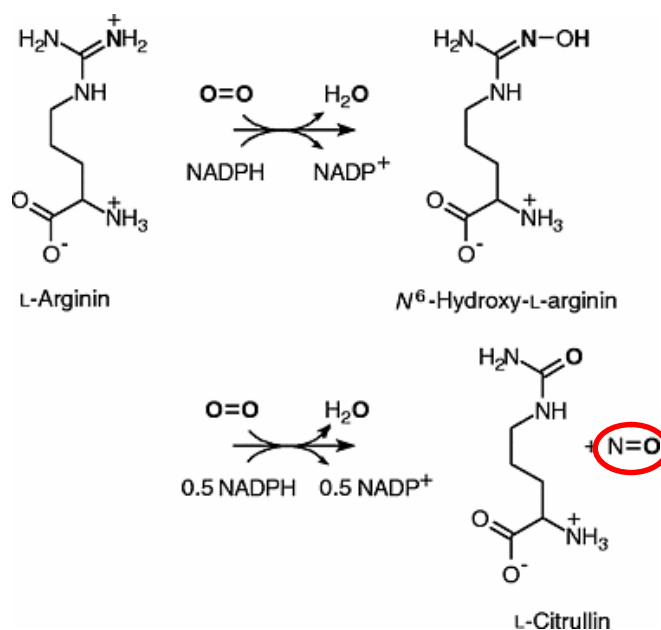


Abb. 7: Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin [2]

Zusätzlich zu seiner toxischen Wirkung besitzt NO eine gefäßentspannende Wirkung, weswegen NO freisetzende Medikamente wie Nitroglyzerin bei Herzkrankheiten zum Einsatz kommen. Die Wirkung ist allerdings lokal begrenzt, da das gasförmige NO im extrazellulären Bereich sofort mit Sauerstoff und Wasser zu Nitrit bzw. Nitrat reagiert. Dieser Umstand wird genutzt, um die Stimulation von Makrophagen durch einen indirekten Nachweis von Stickstoffmonoxid mit Hilfe einer Farbreaktion nachzuweisen (Kap. 4.9) [2]. Zusätzlich zum Nachweis von NO als direktem Mediator der Immunantwort, können auch die sekretierten Proteine einen Aufschluss über die in den Zellen ablaufenden Reaktionen als Antwort auf eine Infektion geben.

2.2.4 Stimulation der Makrophagen

Die Stimulation der Makrophagen erfolgt im Organismus in der Regel während einer Infektion über die Erkennung der eindringenden Mikroorganismen. Bei gram-negativen Bakterien wird dabei meist ein Bestandteil der Zellwand, das Lipopolysaccharid, durch Bindung an zelleigene Rezeptoren erkannt. Bei Lipopolysacchariden handelt es sich um hoch konservierte, chemische Strukturen, die sich aus einem Lipidteil und einem Polysaccharidteil zusammensetzen (Abb. 8). Sie sind in der Bakterienzellwand verankert und wirken als Endotoxin [2]. Die Lipopolysaccharide gehören zu den PAMPs und werden von spezifischen Rezeptoren an der Membranoberfläche der Phagozyten erkannt.

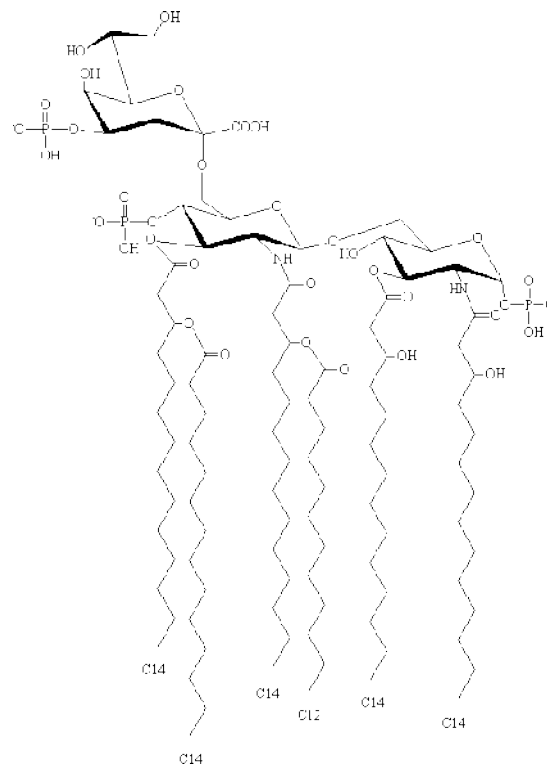


Abb. 8: Chemische Struktur des Lipopolysaccharids (LPS) [32]

Die Freisetzung von LPS im Organismus führt zu Fieber, Kopfschmerzen und Übelkeit und kann im schlimmsten Fall einen septischen Schock auslösen, der zum Tod des Organismus führen kann. Um diesem Fall entgegen zu wirken, wird das LPS von einem wirtseigenen Protein gebunden, dem LPS bindenden Protein (LBP) [17] und kann so von Rezeptoren in der Zellmembran der Makrophagen erkannt werden. Diese Rezeptoren werden Toll Like Rezeptoren (TLR) genannt und es handelt sich dabei um Transmembranproteine (Abb. 9). Sie lösen in der Zelle Signalkaskaden aus, die zu verschiedenen Reaktionen der Makrophagen gegen eine Infektion führen. LPS wird in der vorliegenden Arbeit als Standardstimulanz verwendet. Es bindet an den Toll Like Rezeptor 4 (TLR4) und aktiviert unter anderem den Transkriptionsfaktor NF- κ B [17]. Außer LPS ist der TLR4 in der Lage andere Stoffe, z.B. das Hitzeschock Protein hsp60 und einen weiteren Bestandteil der bakteriellen Zellwand gram-positiver Bakterien, die Lipoteichonsäure (LTA), zu binden [27]. Neben dem bereits erwähnten TLR4 sind bisher zwölf weitere Toll Like Rezeptoren identifiziert worden [26].

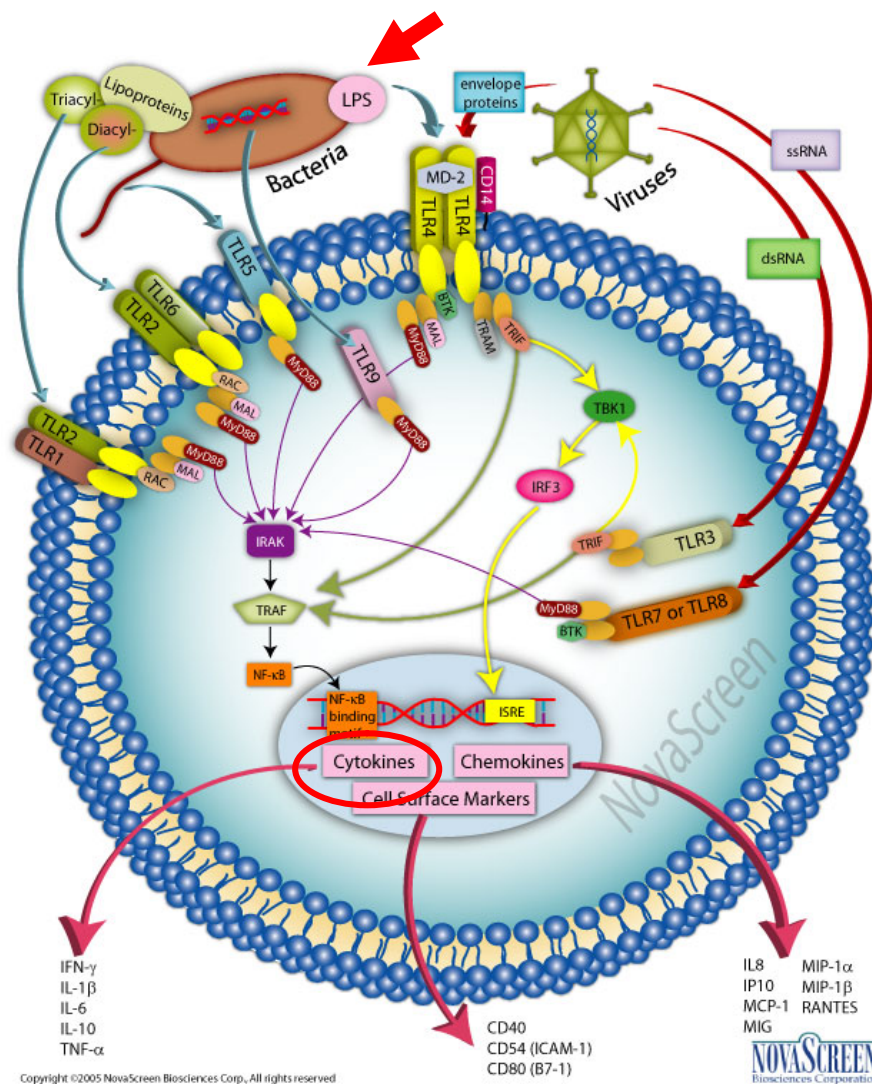


Abb. 9: Schematische Darstellung verschiedener TLRs und der folgenden Signalwege [31]

Die TLR müssen relativ früh in der Entwicklungsgeschichte entstanden sein, da sie sowohl bei Invertebraten, wie der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, als auch bei Säugetieren, wie der Maus oder dem Menschen, zu finden sind [2]. Die Proteine besitzen eine extrazelluläre Domäne (Abb. 9), mit der sie konservierte Oberflächenstrukturen von Mikroorganismen binden können. Zu diesen PAMPs zählen unter anderem Peptidoglycane bei gram-positiven Bakterien, Lipopolysaccharide bei gram-negativen Bakterien und Mannane bei Pilzen [28]. Diese Strukturen sind essentiell für die Mikroorganismen und liegen deswegen so gut wie nie in mutierter Form vor, was sie zu sehr guten Zielen für eine Erkennung als Fremdpartikel macht. Die Rezeptoren binden diese Strukturen, zum Teil auch mit Hilfe von Cofaktoren wie LBP, dimerisieren und lösen durch Konformationsänderungen im Zellinneren Signalkaskaden aus, die über die Aktivierung spezieller Transkriptionsfaktoren zur Expression von entzündungsfördernden Proteinen führen. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem die in Kapitel 2.2.6 erwähnten Cytokine. Die Aktivierung der TLRs ist ein deutlicher Hinweis auf eine Infektion bzw. das Eindringen eines Mikroorganismus in den Körper [16]. Als einer der Hauptsignalwege, welcher nach Aktivierung der TLRs eingeschaltet wird, ist der NF- κ B Signalweg (Kap. 2.2.5) zu nennen, der zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt [16]. Dieser aktiviert viele Gene, welche eine gezielte Immunantwort, z.B. über die Produktion von Cytokinen wie Interleukin 6, vermitteln [18]. Ein zweiter Signalweg führt zur Aktivierung der p38 Mitogen Activated Protein Kinase (p38MAPK) und der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK), die ebenfalls entzündungsspezifische Gene aktivieren [16]. Neben den membrangebundenen Rezeptoren existieren im Cytosol auch lösliche, nicht membrangebundene Rezeptoren, wie die Mitglieder der Nucleotide-binding Oligomerisation Domain (NOD) Familie, die ebenfalls in der Lage sind bakterielle Produkte zu erkennen [27]. Durch Kombination und Heterodimerbildung der TLRs untereinander ergibt sich ein sehr breit gefächertes Erkennungsspektrum für die verschiedensten Liganden und somit eine sehr effektive Reaktion auf mikrobielle Eindringlinge. Für die Weiterleitung der Signale sind die den Rezeptoren nachgeschalteten Signalkaskaden von zentraler Bedeutung.

2.2.5 Signalkaskaden der aktivierten Makrophagen

Die Expression von pro-inflammatorischen Genen als Reaktion auf die Stimulierung von Phagozyten durch die Aktivierung von TLR, ist durch eine Vielzahl von Signalwegen reguliert. Diese Signalwege beginnen in der Regel mit einem Rezeptor in der Zellmembran, wie den TLRs oder dem Interleukin Rezeptor (IR), und haben die Aktivierung eines

Transkriptionsfaktors zur Folge. Im Laufe eines solchen Signalwegs müssen verschiedene Proteine aktiviert bzw. deaktiviert werden. In höheren Zellen ist eine Aktivierung oder Deaktivierung meist mit einer Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung verbunden, d.h. es werden Phosphate, die von ATP-Molekülen stammen, auf die Proteine übertragen bzw. von ihnen abgespalten. Die Enzyme, welche diese Reaktion vermitteln, werden Kinasen bzw. Phosphatasen genannt und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation von Zellfunktionen. Dabei unterscheiden sich die Enzyme durch die Aminosäuren, die sie spezifisch phosphorylieren und dephosphorylieren können. Es existieren Serin/Threonin-, Tyrosin- und Histidin-Kinasen bzw. Phosphatasen. Eine besondere Gruppe der Proteinkinasen sind die Mitogen aktivierten Proteinkinasen (MAPK), da sie an der direkten Aktivierung von Transkriptionsfaktoren beteiligt sind. Sie werden ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert und sind Teil einer MAPKinase-Kaskade an deren Ende die Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B stehen. Sie wandern in den Zellkern und aktivieren bestimmte Gene als Antwort auf die Stimulation des Rezeptors an der Zellmembran. Auf diese Weise wird z.B. die Bildung von Cytokinen und NO als Reaktion auf Bakterien bzw. andere Mikroorganismen vermittelt. Dabei werden drei Gruppen von MAPK unterschieden: die extrazellulär-regulierten Kinasen (ERK), c-Jun-N-terminale Kinasen (JNK) und die p38 MAPK. Als besonders wichtige und sehr häufig betroffene Signalkaskade soll der NF- κ B Signalweg im Detail dargestellt werden [2]. Der NF- κ B Signalweg ist einer der zentralen Signalwege in eukaryotischen Zellen und wird besonders als stressvermittelte Antwort der Zelle oder als Antwort auf Infektionen aktiviert. Am Ende der Signalkaskade, an der viele Kinasen beteiligt sind, stehen die Transkriptionsfaktoren der Rel/NF- κ B Familie. Es existieren mehrere verschiedene Rel bzw. NF- κ B Untereinheiten, die in der Mehrzahl der Zellen als Homo- oder Heterodimere in inaktiver Form an einen Inhibitor (I κ B) gebunden im Cytoplasma vorliegen (Abb. 10) [22]. Durch Phosphorylierung des Inhibitors, vermittelt von aufwärts gelegenen Kinasen wie der NIK (NF- κ B Inducing Kinase) [18], werden spezielle Kinasen phosphoryliert, die I κ B Kinasen, welche ihrerseits den Inhibitor phosphorylieren. Dadurch wird der Inhibitor-Transkriptionsfaktor-Komplex aufgelöst, der Inhibitor ubiquitinyliert und abgebaut [25]. Da der Inhibitor das nukleäre Lokalisations-Signal (NLS) des Transkriptionsfaktors überdeckt und ihn so an einer Wanderung in den Zellkern hindert, sorgt eine Abspaltung des Inhibitors für eine Lokalisationsänderung des Transkriptionsfaktors in den Zellkern [18]. Dort bindet er an bestimmte DNA-Stellen und reguliert die Expression von entzündungsfördernden Genen [18]. Durch die Kombination der verschiedenen Untereinheiten und das Zusammenwirken mit anderen Transkriptionsfaktoren ergibt sich ein unterschiedliches Expressionsmuster. Diese

Aktivierung ist ligandenspezifisch, d.h. je nachdem, welches Signal am Beginn der Kaskade auftritt, ergibt sich am Ende ein anderes Expressionsmuster. Zusätzlich zu den entzündungsfördernden Genen werden auch die Gene für die Inhibitoren aktiviert, was zu einer Rückkopplung führt und der Regulation des Signalwegs dient [17]. Als Zielgene des Transkriptionsfaktors werden unter anderem die Gene für die Cytokine TNF- α und IL-6 sowie die iNOS aktiviert.

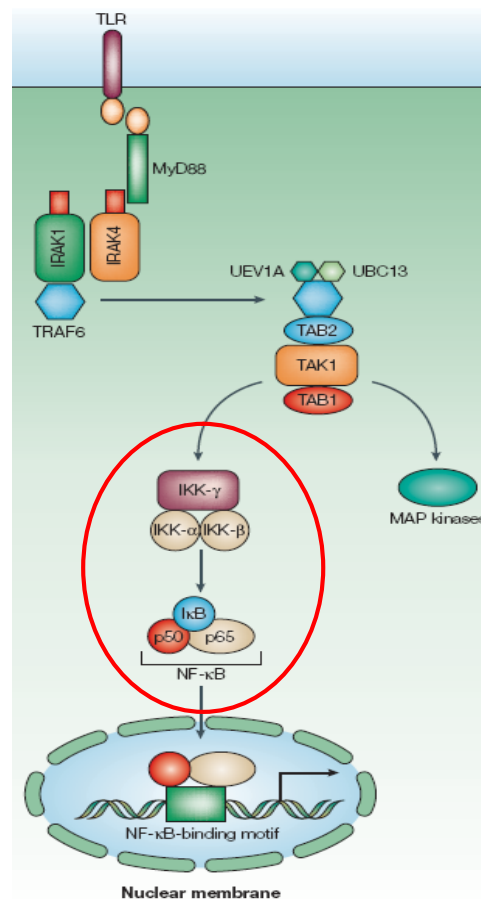


Abb. 10: Signalweiterleitung nach Aktivierung eines Toll like Rezeptors [28]

Die Expression der Rel/NF- κ B Komplexe erfolgt in einer gewebsspezifischen Weise. Da diese Transkriptionsfaktoren auch an der Tumorbildung und an Entzündungserkrankungen beteiligt sind, wird in der klinischen Forschung verstärkt nach NF- κ B hemmenden Stoffen gesucht, um diese Krankheiten zu behandeln [21]. Dabei wird zunehmend an mutierten Inhibitoren gearbeitet, die nicht mehr phosphoryliert werden können und den Transkriptionsfaktor so im Cytosol zurückhalten. Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors kann als Reaktion auf verschiedenste Stimuli erfolgen, so sorgen unter anderem die Cytokine TNF- α und IL-1 [21], das bakterielle LPS, virale Infektionen, UV-Strahlung und freie

Radikale [25] für eine Phosphorylierung des Inhibitors. Verschiedene Substanzen sind in der Lage direkt an den Rezeptoren bzw. an Proteinen innerhalb der Signalwege zu binden und deren Aktivität zu fördern oder zu hemmen.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern bestimmte Naturstoffe aus Myxobakterien einen Einfluss auf die bekannten Signalwege bzw. die anderen Funktionen der Makrophagen, wie die Bildung bestimmter Cytokine, besitzen.

3. Material

3.1 Geräte

Gerät	Firma
• μ -Quant Spektralphotometer	BioTek
• Autoklav	Sauter
• Biofuge fresco	Heraeus
• Brutschrank CO ₂ -Auto-Zero	Heraeus
• Bunsenbrenner Fireboy	IBS Integra Biosciences
• Cytofluor® Multi-Well Plate Reader series 4000	PerSeptive Biosystems
• Easypet	Eppendorf
• Fluoreszenzmikroskop CKX41	Olympus
• Laminair (reine Werkbank) HLB 2448	Heraeus
• Magnetrührer MR 2002	Heidolph
• Model 495 Gradient Former	BioRad
• Mikroskop	Olympus
• pH-Meter	Schott
• Pipetus®-akku	Hirschmann Laborgeräte
• Protean IEF Cell	BioRad
• Protean®Plus Dodeca™ Cell	BioRad
• Protean®Plus Hinged Spacer Plates	BioRad
• Protean®Plus Multi-Casting Chamber	BioRad
• Research Pipette Mehrkanal (8er) variabel: 10-100 μ L	Eppendorf
• Research Pipette Mehrkanal (8er) variabel: 30-300 μ L	Eppendorf
• Research Pipette variabel: 10-100 μ L	Eppendorf
• Research Pipette variabel: 20-200 μ L	Eppendorf
• Research Pipette variabel: 0,1- 2,5 μ L	Eppendorf
• Research Pipette variabel: 0,5-10 μ L	Eppendorf
• Scanner GS-800 Calibrated Imaging Densitometer	BioRad
• Schütteltisch WS2	Bühler

Gerät	Firma
• Sterile Werkbank (Clean bench)	Heraeus
• Stromquelle Power PAC 200	BioRad
• Thermomixer 5437	Eppendorf
• Transferpette ® -8er electronic, variabel: 1- 20µL	Brand
• Transferpette ® -8er electronic, variabel: 15- 300µL	Brand
• Transferpette ® -8er electronic, variabel: 5-100µL	Brand
• Transferpette ® -8er variabel: 10- 100µL	Brand
• Ultraschallgerät Sonoplus 2200	Bandelin
• Vortex-Genie 2	Scientific Industries
• Zählkammer (0,100mm Tiefe; 0,0025mm ²)	Neubauer
• Zentrifuge 5402 mit 18x 1,5-2 mL Rotor	Eppendorf
• Zentrifuge 5804 R mit 30x 1,5-2 mL Rotor	Eppendorf
• Zentrifuge RC5C	Sorvall Instruments

3.2 Chemikalien

Chemikalie	Firma	Artikelnummer
• 2-Mercaptoethanol	Sigma	M-7154
• 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	Boehringer Mannheim	784974
• Albumine bovine (BSA)	Sigma	A-7906
• Ammoniumpersulfat (APS)	Gibco	5523UA
• Acrylamidstammlösung (Rotiphorese®Gel 30)	Roth	3029.1
• Bacto™ Agar	BDFalcon	214010
• BioRad Protein Assay	BioRad	500-0006
• Biotin-POD	Pierce	29139
• Bromphenolblau (3,3',5,5'-Tetrabromphenolsulfonphthalein)	Roth	T116.1
• CSFE (Carboxyl-Fluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester)	Invitrogen	C1157
• Chaps	Sigma	C-9426
• Coomassie Brilliant Blue G250	Biomol	6104-58-1
• Complete Mini Protease Inhibitor tablets	Roche	11836153001
• Cytochalasin B from <i>Helminthosporium</i>	Sigma	C-6762
• Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Sigma	D-8779
• DTT (1,4-Dithio-DL-threitol)	Fluka	43815
• Essigsäure	Roth	3738.5

Chemikalie	Firma	Artikelnummer
• Ethanol	Roth	64-17-5
• Fleischextrakt	Merck	103979
• Glycerin (87%ig)	Merck	1.04094.1000
• Glycerin (99%ig)	Sigma	G-9012
• Iodoacetamid	Sigma	I-1149
• Kaliumdihydrogenphosphat	Merck	2579201
• Kaliumchlorid	Merck	TA741836
• Laemmli Sample Puffer	BioRad	161-0737
• Lipopolysaccharid (LPS) aus <i>E.coli</i>	Sigma	L-8274
• Methanol (MeOH)	J.T.Baker	8045
• Mineral oil	BioRad	163-2129
• MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)	Sigma	M-2128
• N-(Naphthyl)Ethylendiamin Dihydrochlorid	Sigma	N-9125
• N,N-Dimethylformamide (DMF)	Sigma	D-4551
• Natriumacetat	Merck	6268
• Natriumcarbonat	Riedel-deHaen	31432
• Natriumchlorid	Merck	6404.1000
• Natriumdihydrogenphosphat	Merck	6343
• Natriumhydroxid	Riedel-de-Haen	30620
• Ortho-Phosphorsäure	Riedel-de-Haen	30417
• PBS-Tablets	Gibco	18912-014

Chemikalie	Firma	Artikelnummer
• Pepton	Marcor	
• Phosphatase Inhibitor Cocktail I	Sigma	P-2850
• Purvalanol B	Tocris	1581
• Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma	P-5726
• Salzsäure (HCl) rauchend 37% ig	Merck	939K130007317
• Schwefelsäure	Roth	4623.4
• Sodium-dodecyl-sulfate (SDS)	Sigma	L-4390
• Streptavidin	Sigma	S-4762
• Sulfanilamid	Merck	11799
• N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin	Merck	110732
• Thiourea	Sigma	T-8656
• TGS Puffer 10x	BioRad	161-0772
• TNF- α ELISA Kit	Endogen	EMTNFA
• TRIZMA®base	Sigma	T-1503
• TRIZMA®hydrochloride	Sigma	T-3253
• Trypanblau-Lösung	Fluka	93595
• Urea	J.T.Baker	4111-05
• Wasserstoffperoxid 30%	Merck	1.07209.0250
• WST	Roche Diagnostics	11644807001

4-[3-(4-Jodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzoldisulfonat

3.3 Antikörper und rekombinantes Interleukin 6

Chemikalie	Firma	Artikelnummer
• Anti-IL6 Antikörper (Ratte)	R&D Systems	AF-406-NA
• Anti-IL6 Antikörper (Ziege)	R&D Systems	BAF406
• Anti-Ziege IgG Antikörper (HRP konj.)	R&D Systems	HAF-109
• Rekombinantes IL-6	R&D Systems	406-ML-005

3.4 Medien und Serum

3.4.1 Zellkulturmedium

Chemikalie	Firma	Artikelnummer
BioWhittaker™ DMEM	Cambrex	BE12-741F
FBS	Cambrex	14-801F
Einfriermedium (mit DMSO)	Invitrogen	12648-010

Zu 500 mL des Mediums und 50 mL FBS werden unter der sterilen Werkbank gemischt und anschließend als Zellkulturmedium verwendet.

3.4.2 KM1 Medium für *E.coli*

Pepton	5 g/L
Fleischextrakt	3 g/L
Agar Agar	15 g/L
pH:	7,0

5 g Pepton und 3 g Fleischextrakt werden in einem Liter MilliQ Wasser angesetzt und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Nach Sterilisation der Lösung können die *E.coli* Zellen in Erlenmeyerkolben kultiviert werden. Um eine feste Kulturunterlage zu schaffen werden 15 g/L Agar zugegeben, unter der sterilen Werkbank in Petrischalen gegossen und getrocknet. Darauf werden die Bakterien ausplattiert.

3.5 Zellkulturmaterial

- Zellkulturflaschen Wachstumsfläche 25 cm² Falcon
- Zellkulturflaschen Wachstumsfläche 75 cm² Corning
- Zellkulturflaschen Wachstumsfläche 175 cm² Corning
- Cell Scraper 23 cm NUNC™Brand Products
- Cell Scraper 32 cm NUNC™Brand Products
- Microtest™Tissue Culture Plate 96 well Falcon
- Microtest™Tissue Culture Plate 4 well Falcon
- Sterile Wannen (Fassungsvermögen 60 mL) Eppendorf

3.6 Zellkulturen und Bakterien-Stämme

- RAW 264.7 ATCC TIB-71
- *E.coli* ATCC AB1621

3.7 ELISA Kit Systeme

- TNF- α ELISA Kit (EMTNFA) Endogen
- Interleukin 6 ELISA Kit (EM2IL62) Endogen
- TNF- α ELISA Kit (88-7324-77) ebioscience

3.8 IPG-Streifen für zweidimensionale Gelelektrophorese

IPG strips 17 cm, pH 3-10 BioRad 163-2007

3.9 Puffer und Lösungen

3.9.1 PBS Puffer

Der verwendete PBS Standard Puffer wurde aus PBS Tabletten der Firma Gibco hergestellt, wobei je 1 Tablette in 500 mL MilliQ-Wasser gelöst wurde.

3.9.2 Beschichtungspuffer (50 mM)

Zur Herstellung des Beschichtungspuffers der ELISA-Platten, wurden 8 g Natriumchlorid, 1,42 g Natriumdihydrogenphosphat, 0,2g Kaliumdihydrogenphosphat und 0,2 g Kaliumchlorid in 1 L MilliQ gelöst und mit HCl wurde der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt.

3.9.3 Natriumacetatpuffer (100 mM) und Farbreagenz

Der für die Farbreagenz, des selbst zusammen gestellten ELISAs, benötigte Natriumacetatpuffer wurde aus 8,2 g NaAc, gelöst in 1000 mL MilliQ, hergestellt. Der pH-Wert wurde mit Hilfe von Eisessig auf pH 5,5 eingestellt. Zu 10 mL dieses Puffer wurden unmittelbar vor der Farbreaktion 160 μ L TMB-Lösung (6mg gelöst in 1 mL DMSO) und 40 μ L einer 1 %igen H₂O₂-Lösung zugegeben. Diese Mischung wurde auf die ELISA-Platten gegeben.

3.9.4 BSA-Stammlösung (2%ig) zum Blocken

Die verwendete Blocklösung zum Besetzen der freien Bindeplätze in den verwendeten Mikrotiterplatten wurde aus 0,8 g BSA angesetzt, die in 40 mL PBS gelöst wurden. Nach dem Waschen der Platten wurden 300 µL der Lösung in jedes well gegeben.

3.9.5 Lysepuffer für Makrophagen

Um die Proteine aus den Zellen zu gewinnen, mussten die Zellwände der Makrophagen zerstört werden. Dazu wurde ein Lysepuffer aus 10,51 g Harnstoff (Endkonzentration 7 M), 3,806 g Thioharnstoff (Endkonzentration 2 M), 1 g CHAPS (Endkonzentration 4 %) und 1,25 mL Tris-Base-Lösung (Stammlösung 200 mM, Endkonzentration von 10 mM) in 12,5 mL MilliQ-Wasser angesetzt. Diese Lösung wurde mit 5 molarer Salzsäure auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt und mit 100 µL Bromphenolblau (Stammlösung 10 mg/mL) gefärbt. Das Volumen wurde anschließend auf 25 mL mit MilliQ-Wasser aufgefüllt. Zu diesem Puffer wurde eine Tablette der Complete Mini Protease Inhibitoren gegeben, diese gelöst und der Puffer in 1 mL Aliquots bei -20°C eingefroren. Vor Einsatz des Lysepuffers wurden, in die wieder aufgetaute Lösung, je 10 µL Phosphatase Inhibitoren pipettiert, das Ganze gevortext und dann zur Lyse der Zellen verwendet (Kap. 4.3).

3.9.6 Griess Reagenz

Sulphanilamid und N-(1-Naphtyl)ethylendiamin wurden in 5 %iger Ortho-Phosphorsäure angesetzt (1 %ig bzw. 0,1 %ig). Die beiden Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und als **Griess-Reagenz** verwendet. Die entstandene Lösung wurde ebenfalls 1:1 mit der zu vermessenden Probe gemischt, 10 Minuten bei RT stehen gelassen und dann bei 540 nm im µ-Quant Spektralphotometer vermessen. Als Standardsubstanz für die Kalibriergerade wurde Natriumnitrit in Konzentrationen zwischen 0 und 100 µM verwendet. Der Nitritnachweis erfolgte dabei durch die Bildung eines Diazosalzes und der Verfärbung der Lösung.

3.9.7 Acrylamidlösung für zweidimensionale Gelelektrophorese

Zur Herstellung der SDS-Gele für die zweidimensionale Gelelektrophorese wurden 600 mL Acrylamidlösung, 1,2 g SDS (Endkonzentration von 0,1 %) und 300 mL Trizma-Base (Konzentration 1,5 M pH 8,8) in eine 2 Liter Schottflasche gegeben. Zu dieser Lösung wurden 137,87 mL Glycerin (87 %ig) und 162,14 mL MilliQ-Wasser gegeben und im Kühlraum bei 4°C über Nacht gerührt. Am nächsten Tag wurden 6 mL einer 10%igen Ammoniumpersulfatlösung (APS) (Endkonzentration von 0,1 %) und 300 µL N,N,N,N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED) unmittelbar vor dem Gießen der Gele zugegeben. Das TEMED startet die Polymerisationsreaktion der Lösung und musste deshalb möglichst spät zugegeben werden. Dieser Ansatz war ausreichend für 12 SDS-Gele (15 %ig).

3.9.8 Ausgleichslösung für zweidimensionale Gelelektrophorese

Als Ausgleichslösung für die Zulaufschläuche und um weniger Acrylamid zu verbrauchen, wurde aus 30 mL Trizma-Hydrochlorid, in einer Konzentration von 1,5 M und einem pH-Wert von 8,8. 71 mL einer 87 %igen Glycerinlösung bzw. 60,1 mL einer 99 %igen Glycerinlösung und 240 µL einer 1 %igen Bromphenolblaulösung ein Gemisch hergestellt und mit MilliQ auf 120 mL aufgefüllt.

3.9.9 Equilibrierungspuffer für die zweidimensionale Gelelektrophorese

Der Equilibrierungspuffer dient der Vorbereitung der IPG-Streifen für die zweite Dimension der zweidimensionalen Gelelektrophorese. Dazu wurde eine Lösung aus 5 mL Trizma-Hydrochlorid (Konzentration 1,5 M, pH-Wert von 8,8). 36,06 g Harnstoff (Endkonzentration 6 M), 2 g SDS (Endkonzentration 2 %) und 30 mL Glycerin (99 %ig) hergestellt. Das Gemisch wurde mit MilliQ auf 100 mL aufgefüllt und in 10 ml Portionen bei -20°C aufbewahrt. Zur Equilibrierung der IPG-Streifen wurden die Aliquots wieder aufgetaut und zu jeweils 5 mL 200 mg DTT bzw. 250 mg Iodoacetamid zugegeben.

3.9.10 Lagerpuffer für zweidimensionale Gele

Zur Lagerung der zweidimensionalen Gele wurden diese mit den sie umgebenden Glasplatten in verschließbaren Plastikboxen in einem Lagerpuffer bei 4°C aufbewahrt. Dazu wurden 363,42g Trizma-Base in MilliQ-Wasser gelöst (Endkonzentration 5 M), der pH-Wert mit Hilfe von HCl auf 8,8 eingestellt und das Ganze MilliQ auf 2 Liter mit aufgefüllt. Zusätzlich

zu dem Puffer wurden die Gele mit Zellstoff umwickelt um eine konstante Feuchtigkeit der Gele zu gewährleisten.

3.9.11 1,5 %ige Agarose-Lösung zur Fixierung der IPG-Streifen

Um die IPG-Streifen für die zweite Dimension der 2D-Gelelektrophorese auf den SDS-Gelen zu fixieren, wurden 1,5 g Agarose in 100 mL TGS-Puffer (Laufpuffer für die Gelelektrophorese) gelöst. Zu dieser Lösung wurden 250 µL Bromophenolblau-Lösung (Konzentration 1 µg/µL in MilliQ) gegeben

3.9.12 Fixierlösung für die zweidimensionalen Gele

Die Gele mussten nach der SDS-Gelelektrophorese fixiert werden, um sie für eine Anfärbung vorzubereiten. Dazu wurde aus 100mL Essigsäure, 400mL MeOH und 500ml MilliQ-Wasser eine Fixierlösung hergestellt in der die Gele für eine Stunde verblieben. Danach wurden die Gele für zweimal 15 Minuten in MilliQ-Wasser gewaschen und anschließend mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

3.9.13 Coomassie Brilliant Blue Färbung

Die fixierten Proteine wurden in den zweidimensionalen Gelen mit Hilfe des Coomassie Brilliant Blue Farbstoffes sichtbar gemacht. Dazu wurde aus zwei verschiedenen Lösungen eine mehrfach verwendbare Färbelösung hergestellt. Lösung A setzte sich dabei aus 20 g Phosphorsäure (85 %ig), 100 g Ammoniumpersulfat (APS), 800 ml MilliQ und 980 mL destilliertem Wasser zusammen. Lösung B bestand aus 5 g Coomassie Brilliant Blue G250 in 100 mL MilliQ. Diese beiden Lösungen wurden in einem Verhältnis von 98 % (Lösung A) und 2 % (Lösung B) gemischt und auf ein Gesamtvolumen von 1500 mL aufgefüllt. Zu dieser Lösung C wurden 375 mL MeOH zugegeben und mit dieser Lösung D die Gele über Nacht (mindestens 14 Stunden) gefärbt. Dazu wurden die Gele in verschließbare Plastikwannen gegeben und auf einem Schütteltisch (200 U/min) geschüttelt. Am nächsten Tag wurden die Gele mit MilliQ gewaschen um den Hintergrund wieder zu entfärben. Nach Erreichen der gewünschten Färbeintensität wurden die 2D-Gele mit Hilfe des Densitometers der Firma BioRad eingescannt und konnten nun für etwa drei Monate im Lagerpuffer (siehe 3.9.10) bei 4°C gelagert werden.

4. Methoden

4.1 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer improved Zählkammer (Tiefe 0,100mm, Fläche 0,0025mm²) bestimmt. Die Zellen der Zelllinie RAW 264.7 wurden dafür vom Boden der Zellkulturflaschen abgekratzt und 10 µL der Zellsuspension auf die Zählkammer aufgetragen. Bei 10 facher Vergrößerung wurden die Zellen in den vier Großquadraten ausgezählt (Abb.11). Aus diesen Zählungen wurde der Mittelwert gebildet und mit 10.000 multipliziert (ergibt sich aus der Fläche der Zählkammer). Dies ergibt die Zellzahl pro Milliliter.

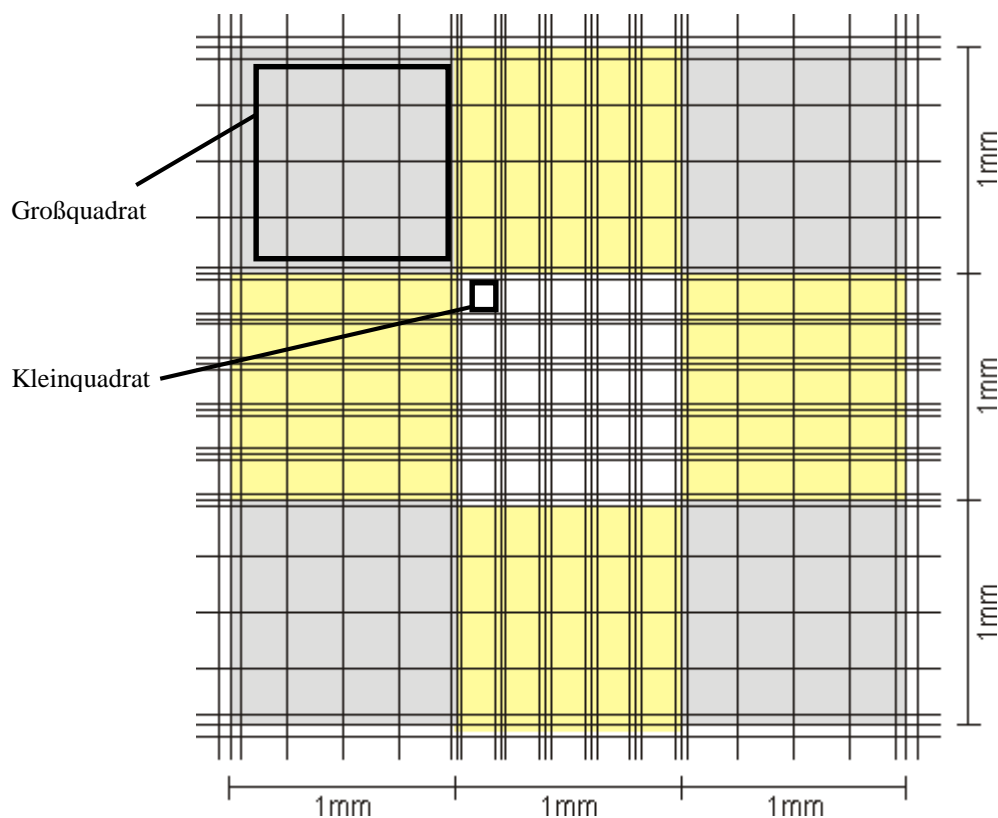


Abb. 11: Schema einer Neubauer improved Zählkammer [67]

Zur Zählung von Bakterienzellen wurde die Kammer ebenfalls mit 10 µL Zellsuspension befüllt. Bei 40 facher Vergrößerung wurden diagonal 5 Kleinquadrate ausgezählt, mit 5 multipliziert (ergibt die Fläche eines Großquadrats) und ebenfalls mit 10.000 multipliziert. Die Bestimmung der Zellzahl wurde mehrfach wiederholt und aus allen Zählungen der Mittelwert gebildet. Vorher durchgeführte Verdünnungen mussten berücksichtigt werden.

4.2 Zellkultivierung und Kryokonservierung der Zelllinie bzw. der Bakterien

Die adhärente Zellkultur RAW 264.7 wurde in DME-Medium (Cambrex) gehalten bis die Zellen konfluent waren. Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (Falcon) bzw. beschichteten 96-well-Platten (Nunc) ausgesät und bei 37°C und 10% CO₂-Begasung im Inkubationsschrank kultiviert. Die Zellen wurden für die verschiedenen Versuchsansätze bis zur Konfluenz bzw. bis zur gewünschten Zellzahl wachsen gelassen. Zur weiteren Verwendung wurden die Zellen mit verschiedenen Substanzen und jeweils der Zellüberstand bzw. die intrazellulären Proteine verwendet.

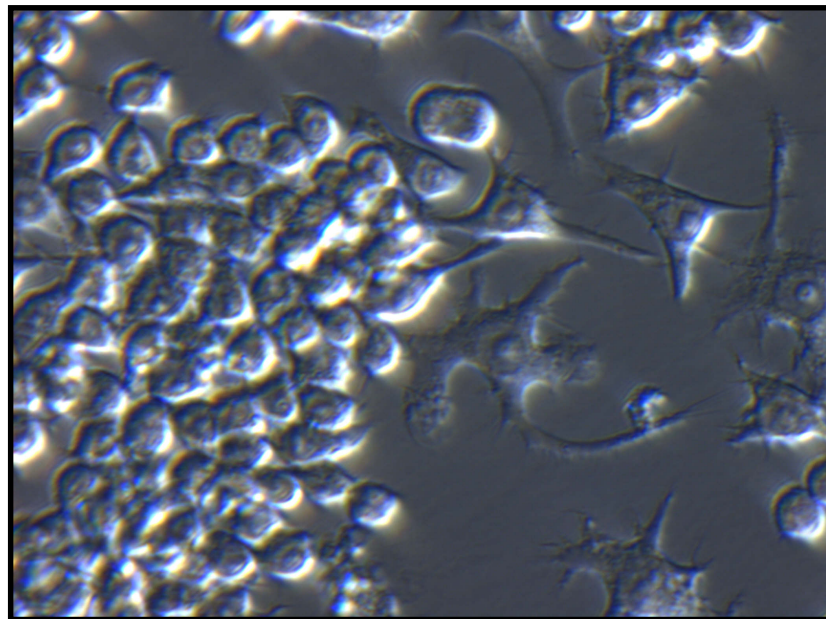


Abb. 12: Zellkultur nach 3 Tagen Wachstum bei 40 facher Vergrößerung

Um die Zellen über längere Zeit zu lagern, wurden sie vom Boden der Zellkulturflaschen abgekratzt und die Zellsuspension in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt. Die Suspension wurde für 5 Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 1 mL Einfriermedium aufgenommen und mit einer sterilen Pasteurpipette resuspendiert. Die Lösung wurde in ein Kryoröhrchen überführt und über Nacht bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurde das Röhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Zur Wiederaufnahme der Kultivierung wurden die Zellen bei RT aufgetaut und in 9mL DME-Medium gegeben. Nach einem Tag Wachstum wurde das Medium abgenommen, und die adhärenen Zellen mit frischem Medium überschichtet und wie gewohnt kultiviert.

Die Bakterien des Stammes *E.coli* wurden in 100 mL Erlenmeyerkolben in 20 mL KM1 Medium angeimpft und für etwa 14 Stunden bei 37°C kultiviert. Die Zellzahl wurde bestimmt

und die Bakterien laut Protokoll (Kap. 4.5) gefärbt. Zur längeren Kultivierung wurden die Bakterien auf Agarplatten (Kap. 3.4.2) ausplattiert und bei 4°C gelagert.

4.3 Lyse der Zellen

Die adhären wachsenden Zellen wurden zur Lyse vom Boden der Zellkulturflaschen abgeschabt. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 500 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 10 mL PBS resuspendiert und erneut für 10 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zwei Mal wiederholt, wobei der wässrige Überstand jeweils verworfen wurde. Das entstandene Pellet wurde in 1 mL des Harnstofflysepuffers (Kap. 3.9.5) aufgenommen und für eine Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurde die Probe für 20 Sekunden bei maximal 25 % der Leistung mit Ultraschall (Sonoplus 2200) behandelt. Die zerstörten Zellen wurden für 1 Stunde bei 18.000 rpm zentrifugiert, die Proteinlösung abgenommen und der Proteingehalt mit Hilfe des Protein Assays bestimmt. Die Proteinlösung konnte bis zur Weiterverwendung bei -80°C aufbewahrt werden.

4.4 Proteinbestimmung des Lysats

Der Proteingehalt der lysierten Zellen musste für die nachfolgenden Versuche bestimmt werden. Dazu wurde der Protein Assay (Bradford) der Firma BioRad verwendet. Dieser wurde 1:5 mit MilliQ verdünnt und dann 200 µL in je ein well einer 96-well Mikrotiterplatte gegeben. Zu diesen 200 µL wurden jeweils 5 µL der zu vermessenden Probe gegeben. Als Standardreihe wurde Rinderalbumin (BSA) in verschiedenen Konzentrationen angesetzt und ebenfalls mit der Bradford-Lösung gemischt. Die Probe wurde bei 595 nm im µQuant Spektralphotometer vermessen. Die BSA Werte wurden in einer Kalibriergeraden dargestellt und verwendet um die Proteinkonzentrationen der restlichen Proben zu vermessen.

4.5 CFSE-Färbung von *E.coli*

E.coli Zellen wurden über Nacht in einem 100 mL Erlenmeyerkolben in 20 mL KM1-Medium kultiviert. Die Bakterien wurden mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt (Kap. 4.1) und 1×10^9 Zellen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (3 Minuten, 5000 rpm) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 mL PBS suspendiert und erneut abzentrifugiert, dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt um Medien-Bestandteile, die eine Färbung stören könnten, zu entfernen. Danach wurden die Bakterien wieder in 1 mL PBS resuspendiert. Zu dieser Lösung wurden

1,5 μL CFSE gegeben und auf dem Thermomixer für 1-2 Stunden bei 37°C geschüttelt. Die Fluoreszenz der Bakterien wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert (Abb. 13). Danach wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und dreimal mit PBS gewaschen um überschüssigen Farbstoff aus der Lösung zu entfernen. Nun wurden die Bakterien im Thermomixer für 2 Stunden auf 65°C erhitzt und so abgetötet. Danach wurden sie erneut abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde bis zum Gebrauch bei -20°C eingefroren. Zum Gebrauch wurde 1 mL DME-Medium zugegeben und mit dem Medium die gewünschte Zellzahl durch Verdünnung hergestellt.

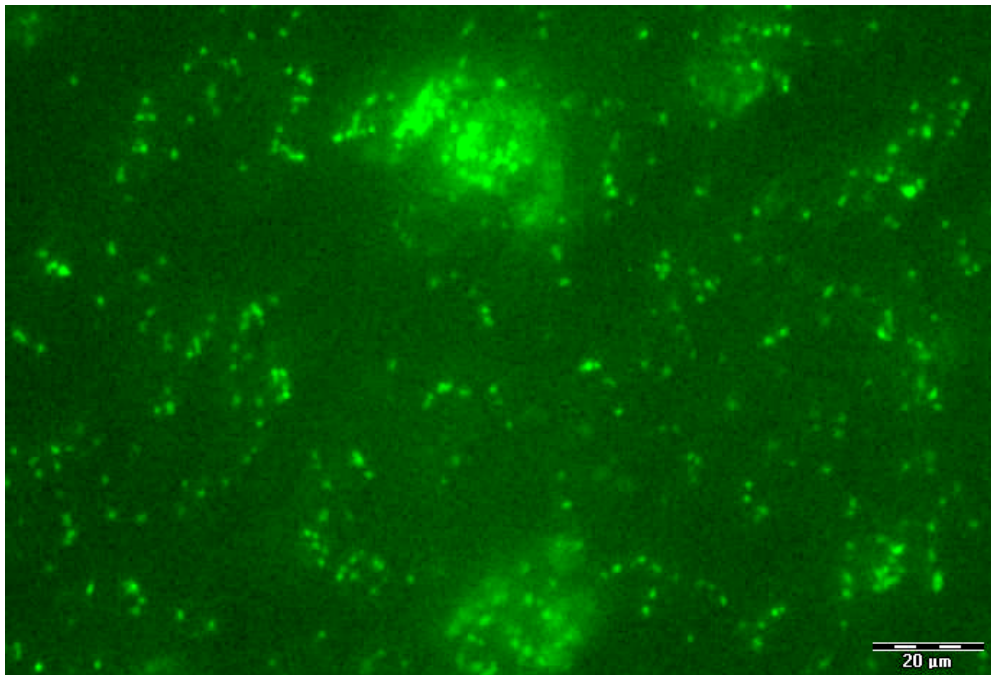


Abb. 13: Fluoreszenzfärbung der *E.coli* Zellen mit CFSE

4.6 Einfluss der Substanzen auf die Zellvitalität (WST-Test)

Die RAW 264.7 Zellen wurden vom Boden der Zellkulturflasche abgekratzt, gezählt und auf 50.000 Zellen/mL verdünnt. Pro Ansatz (1x 96-well Platte) wurden 10 mL Zellsuspension benötigt. Mit einer Mikrotiterplatte konnte der Einfluss von 2 Substanzen untersucht werden. Die Reihen B-G einer 96-well Platte wurden mit 120 μL Zellsuspension gefüllt und bei 37°C in den Brutschrank gestellt. In einer zweiten Platte wurden in den Reihen B-G 100 μL Medium vorgelegt. In die ersten wells der Reihen B und C wurden 50 μL der zu testenden Substanz gegeben, in die ersten wells der Reihen D und E 50 μL der zweiten zu testenden Substanz und in die ersten wells der Reihen F und G je 50 μL Methanol bzw. das jeweilige Lösungsmittel der zu testenden Substanzen zugegeben. Dies wurde durch Auf- und Abpipettieren gemischt, dann wurden jeweils 50 μL aus dem ersten well ins zweite überführt,

gemischt und 50 μL aus dem zweiten well in das dritte usw. Die 50 μL aus dem letzten well wurden verworfen. Dadurch wurde die Substanz seriell 1:3 verdünnt. Aus dieser Substanzplatte gemischten Proben wurden 60 μL in die entsprechenden wells der Platte mit der Zellsuspension pipettiert, was zu einer erneuten 1:3 Verdünnung der Substanz führte (Abb. 14). Dazu wurde mit der kleinsten Verdünnung begonnen. Diese Platten wurden für fünf Tage bei 37°C und 10 % CO_2 im Brutschrank inkubiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Substanz A											
C	50 μL											
D	Substanz B											
E	50 μL											
F	MeOH											
G												
H												

Abb. 14: Skizze der Plattenbelegung für WST-Test

Am fünften Tag wurden die Zellen abzentrifugiert (10 Minuten, 3000 rpm) und jeweils 10 μL WST pro well zugegeben. Nach einer Reaktionszeit von einer Stunde bei 37°C im Brutschrank wurde die Absorption bei 540 nm gemessen.

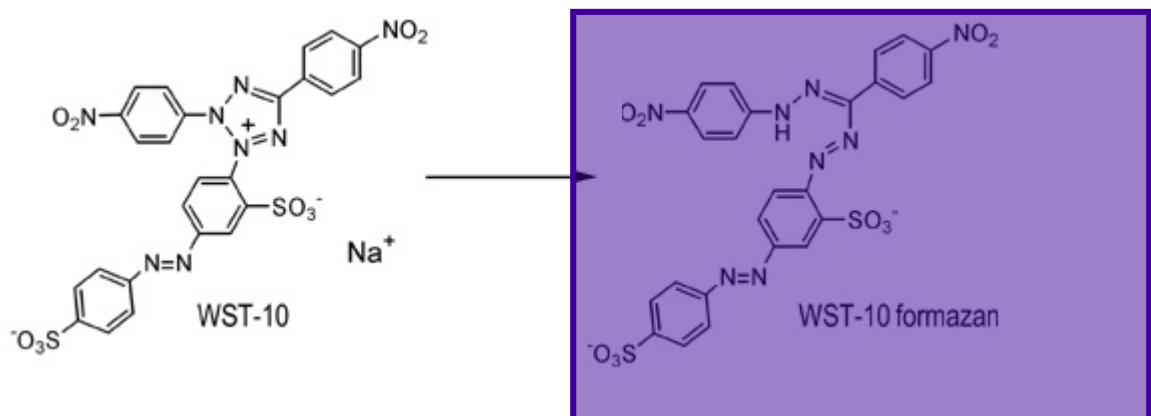


Abb. 15: Darstellung der chemischen Reaktion des WST zu Formazan [46]

Das zugegebene Tetrazoliumsalz (4-[3-[4-Jodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzoldisulfonat (Wst-1) wird dabei durch aktive mitochondriale Dehydrogenasen zu einem wasserlöslichen Formazansalz reduziert (Abb. 15).

4.7 Phagozytose-Assay

Die RAW 264.7 Zellen wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen für 4 Tage kultiviert, bis sie konfluent gewachsen waren. Die Zellen wurden dazu in 50 mL DME-Medium 1:10 aus einer Vorkultur angesetzt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen vom Boden abgekratzt und gezählt. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/mL verdünnt und dann in 5-6 96-well Platten mit 100 µl Zellsuspension pro well ausgesät. Die Zellen wurden für 2 Stunden bei 37°C kultiviert um eine Anheftung an den Boden der wells zu ermöglichen. Eine Reihe jeder Platte wurde für die Zugabe von gefärbten *E.coli* leer gelassen (Kontrolle der Fluoreszenz und des Quenchings). Nach zwei Stunden Kultivierung im Brutschrank bei 37°C wurden die Substanzen zur Vorinkubation mit den Zellen zugegeben, dabei wurden verschiedene Inkubationsdauern gewählt: 30 Minuten, 2 Stunden, über Nacht (etwa 14 Stunden) und 70 Stunden. Nach dieser Zeit wurde das Medium abgenommen und 100 µL *E.coli* (Konzentration 1×10^8 pro mL), die in DMEM suspendiert und mit CFSE gefärbt waren, pro well zugeben. Die Bakteriensuspension enthielt ebenfalls die Substanz in der zuvor gewählten Konzentration.

Eine Reihe der Mikrotiterplatte enthielt nur Makrophagen als Kontrolle für die Eigenfluoreszenz der Makrophagen. Eine Reihe enthielt nur Makrophagen und *E.coli* als Kontrolle für die stattfindende Phagozytose. Die Substanzen wurden zugegeben, Cytochalasin B diente dabei als Positivkontrolle (Endkonzentration 5 µg/mL). Nach den gewählten Zeitpunkten (0, 30, 60 und 90 Minuten) wurde die Fluoreszenz zuerst mit Medium vermessen. Die Messung erfolgte dabei im Cytofluor von unten, die Anregungswellenlänge lag bei 485 nm und die Emissionswellenlänge bei 530 nm. Nach der Messung wurde das Medium ausgeschlagen bzw. mit einer Mehrkanalpipette abgenommen und pro well 100 µL Trypanblau (1:16) zugeben. Die Platten wurden für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert, Trypanblau abgenommen und die Fluoreszenz der einzelnen wells bestimmt. Trypanblau färbt tote Zellen blau und ist ein Quencher für die Fluoreszenz des Fluoresceins. Intakte Zellmembranen sind für Trypanblau nicht durchlässig, so dass die Fluoreszenz von phagozytierten Partikeln nicht überdeckt wird (Abb. 16). Damit tragen phagozytierte *E.coli* zum Fluoreszenzsignal bei, die resultierenden Werte wurden als Maß für die

Phagozytoseaktivität gesehen und auf den Kontrollwert der Makrophagen und *E.coli* ohne Substanz normiert.

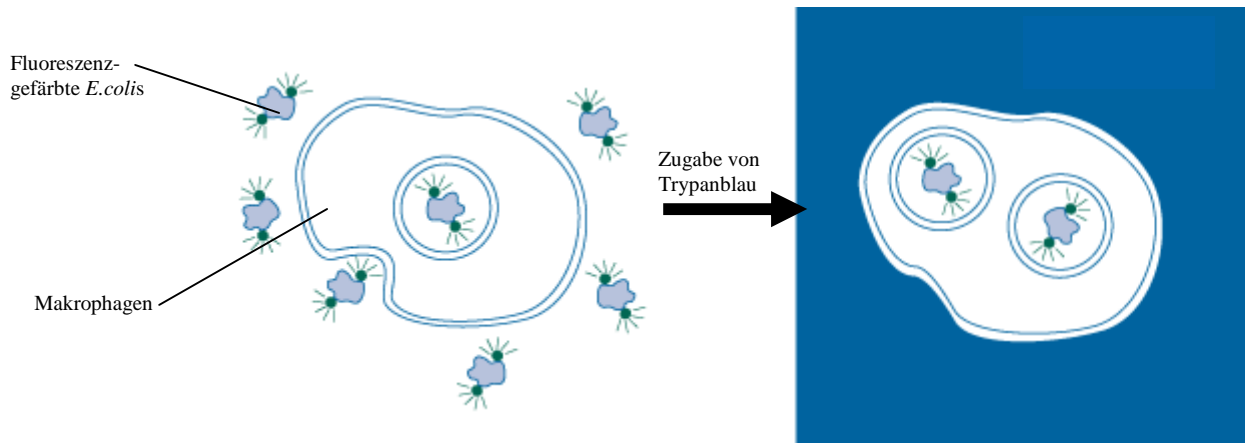


Abb. 16: Schematische Darstellung des Phagozytoseassays [39]

4.8 Enzym Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Der „Enzym Linked Immuno Sorbent Assay“ ist eine Technik, bei der die spezifische Bindung eines Antikörpers an ein Antigen als Nachweismethode für bestimmte Substanzen genutzt wird. Es kann dabei zwischen kompetitiven und nicht kompetitiven Tests unterschieden werden. Bei den kompetitiven Tests tritt eine Konkurrenzreaktion zwischen einer konstanten Menge markierten Antigens und unmarkiertem Antigen aus der zu untersuchenden Probe auf. Wenn das unmarkierte Antigen in größerer Menge als das markierte vorliegt, kann es häufiger an den Antikörper binden und das erzeugte Signal wird schwächer. Bei den nicht kompetitiven Tests wird das Antigen direkt durch einen markierten AK nachgewiesen. Dabei wird in der Regel ein gegen das Antigen gerichteter AK auf einer Oberfläche fixiert. Zu diesem AK wird die Probe mit dem darin enthaltenen Antigen gegeben, dessen Bindung dann mit Hilfe eines Detektionsantikörpers nachgewiesen wird. Dieser Aufbau wird als Sandwich-ELISA bezeichnet, da das Antigen wie bei einem Sandwich zwischen den beiden Antikörpern gefangen liegt (Abb. 17). Es handelt sich um einen symmetrischen Sandwich-Test, wenn der gleiche Antikörper zum Binden und zum Detektieren verwendet wird. Dabei muss der Detektionsantikörper markiert sein, da ein zweiter gegen den Detektionsantikörper gerichteter AK auch mit dem beschichtenden AK reagieren und das Ergebnis verfälschen würde. Wenn die beiden AK sich unterscheiden, handelt es sich um einen asymmetrischen Test. Hierbei muss der Detektionsantikörper nicht unbedingt markiert sein, sondern kann mit einem zweiten markierten AK nachgewiesen werden. Der Nachweis der Bindung erfolgt sowohl bei den symmetrischen als auch bei den asymmetrischen Tests über eine Enzymreaktion, die in der Regel eine Farbreaktion

katalysiert. Die am häufigsten verwendeten Enzyme sind dabei die Meerrettichperoxidase (HRP), die alkalische Phosphatase (AP) und die β -Galactosidase (β -GAL).

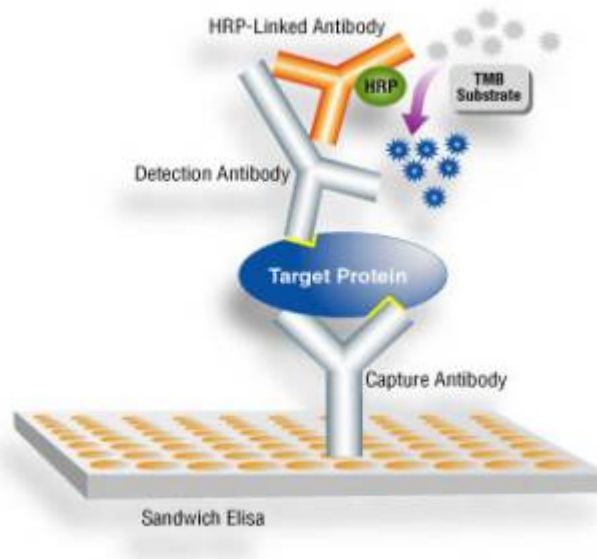


Abb. 17: Schematische Darstellung eines Sandwich ELISA [40]

Dabei unterscheiden sich die Enzyme vor allem in den verwendeten Substraten und der Geschwindigkeit der Farbentwicklung [2][5][6]. Als Substrat für die in dieser Arbeit verwendeten HRP gekoppelten Antikörper wurde Tetramethylbenzidin (TMB) mit H_2O_2 verwendet. In Abbildung 17 ist der schematische Aufbau eines Sandwich ELISA dargestellt, bei dem der Detektionsantikörper auf einer 96-well Mikrotiterplatte aufgetragen ist. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit dieser Art des ELISA gearbeitet.

4.8.1 TNF- α ELISA

Der ELISA zum Nachweis des Tumor Nekrose Faktors α wurde laut Protokoll der Firma **endogen** (Artikelnummer ENTNFA2) bzw. nach Protokoll der Firma **ebioscience** (Artikelnummer 88-7324-88) durchgeführt (Tab. 2)

Tabelle 2 : Protokolle für TNF- α ELISAs

TNF-a	ebioscience 88-7324-88	endogen EMTNFA2
Beschichten der Platten	100 μ L/well Capture Antikörper über Nacht bei 4°C	
Waschen der Platten	5 x 250 μ L/well Waschpuffer	

Blocken der freien Bindestellen	200 µL/well Assay Diluent bei RT für eine Stunde	
Waschen der Platten	5 x 250 µL/well Waschpuffer	
Standards und Proben	100 µL/well bei RT für zwei Stunden	50 µL/well + biotinylierter AK bei RT für zwei Stunden
Waschen der Platten	5 x 250 µL/well Waschpuffer	5 x 300µL/well Waschpuffer
Detektionsantikörper	100 µL/well bei RT für eine Stunde	
Streptavidin-HRP Lösung		100 µL/well bei RT für 30 Minuten
Waschen der Platten	5 x 250 µL/well Waschpuffer	5 x 300 µL/well Waschpuffer
Avidin-HRP-Lösung	100 µL/well bei RT für 30 Minuten	
Waschen der Platten	5 x 250 µL/well Waschpuffer	
Substrat-Lösung (TMB)	100 µL/well bei RT für 15 Minuten	100 µL/well im Dunklen bei RT für 30 Minuten
Stop der Reaktion	50 µL/well	100 µL/well
Vermessen der Proben	bei 450 nm	bei 450 nm
Gesamtzeit	etwa 5 Stunden (+ über Nacht Inkubation)	etwa 3 ½ Stunden

4.8.2 Interleukin 6 ELISA

Der kommerziell erworbene Interleukin 6 ELISA (EM2IL62) der Firma endogen wurde laut Protokoll durchgeführt (Tab. 3)

Tabelle 3: Protokolle für die IL-6 ELISAs

IL-6	Selbstzusammengestellter ELISA	Endogen EM2IL62
Beschichten der Platten	100 µL/well IL-6 AK (s. 2.3) über Nacht bei 4°C	
Waschen der Platten	3 x 200 µL/well PBS-Puffer	
Blocken der freien Bindestellen	300 µL/well BSA-Lösung (s. 2.9.4) bei 37°C für eine Stunde	

Waschen der Platten	3 x 200 µL/well PBS-Puffer	
Standards und Proben	100 µL/well bei 37°C für eine Stunden	50 µL/well bei RT für zwei Stunden
Waschen der Platten	3 x 200 µL/well PBS-Puffer	3 x 300 µL/well Waschpuffer
Biotinylierter AK		50 µL /well bei RT für eine Stunde
Anti-IL6 AK (aus Ziege) (s. 2.3)	100 µL/well bei 37°C für 1 ½ Stunden	
Waschen der Platten	3 x 200 µL/well PBS-Puffer	3 x 300 µL/well Waschpuffer
Detektionsantikörper (anti-goat-HRP, s. 2.3)	100 µL/well bei 37°C für eine Stunde	
Streptavidin-HRP Lösung		100 µL/well bei RT für 30 Minuten
Waschen der Platten	3 x 200 µL/well PBS-Puffer	3 x 300 µL/well Waschpuffer
Waschen der Platten	5 x 250 µL/well PBS-Puffer	
Substrat-Lösung (TMB)	100 µL/well bei RT für 15 - 30Minuten	100 µL/well im Dunklen bei RT für 30 Minuten
Stop der Reaktion	50 µL/well H ₂ SO ₄	100 µL/well
Vermessen der Proben	bei 450nm	bei 450nm
Gesamtzeit	etwa 5 ½ Stunden (+ über Nacht Inkubation)	etwa 4 ½ Stunden

Alternativ zu dem ELISA von endogen wurden 96-well Mikrotiterplatten zunächst mit gegen das IL-6 gerichteten Antikörper beschichtet (Tab. 3 Mitte). Dazu wurden der anti-IL6 Antikörper 1:100 im Beschichtungspuffer (Kap. 3.9.2) verdünnt. Die BSA-Lösung sollte die nicht vom Antikörper besetzten Bindestellen abdecken, um eine spätere unspezifische Bindung der anderen Antikörpern zu vermeiden. Als Standardprotein wurde rekombinantes IL6 verwendet und in folgenden Konzentrationen im Beschichtungspuffer angesetzt: 5000 pg/mL, 2500 pg/mL, 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/ml. Als Nullwert wurde der Puffer allein verwendet. 100 µL der Standards wurden pro well eingesetzt und jeweils als Doppelansätze auf die Mikrotiterplatte aufgebracht. Die Medienüberstände der behandelten Zellen wurden als Drei- bis Vierfachbestimmungen analysiert. Der anti-goat-IgG-HRP Antikörper wurde 1:10.000 verdünnt.

4.9 Indirekter Nachweis von Stickstoffmonoxid mit Hilfe der Griess-Reaktion

Das von den Makrophagen ins Medium abgegebene Stickstoffmonoxid (NO) reagierte außerhalb der Zellen mit dem im Zellkulturmedium vorliegenden Sauerstoff zu Nitrat (NO_3^-) bzw. zu Nitrit (NO_2^-) (Kap. 2.2.3). Diese Oxidationsprodukte können mittels einer chemischen Reaktion (Abb. 18) sichtbar gemacht werden. Dazu wurde eine 1:1 Mischung aus Sulphanilamid (1 %ig in 5 %iger Phosphorsäure) und N-(1-Naphtyl)ethyldiamin (0,1 %ig in 5 %iger Phosphorsäure) angesetzt. Diese Mischung wurde im Verhältnis 1:1 zu den zu vermessenden Proben eingesetzt. Als Standard zur Erstellung einer Kalibriergeraden wurde Natriumnitrit verwendet und in Konzentrationen von 0-100 μM eingesetzt. Als Verdünnungsmittel wurde hierbei das verwendete Zellkulturmedium (DMEM) eingesetzt. Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert und dann bei 540 nm vermessen.

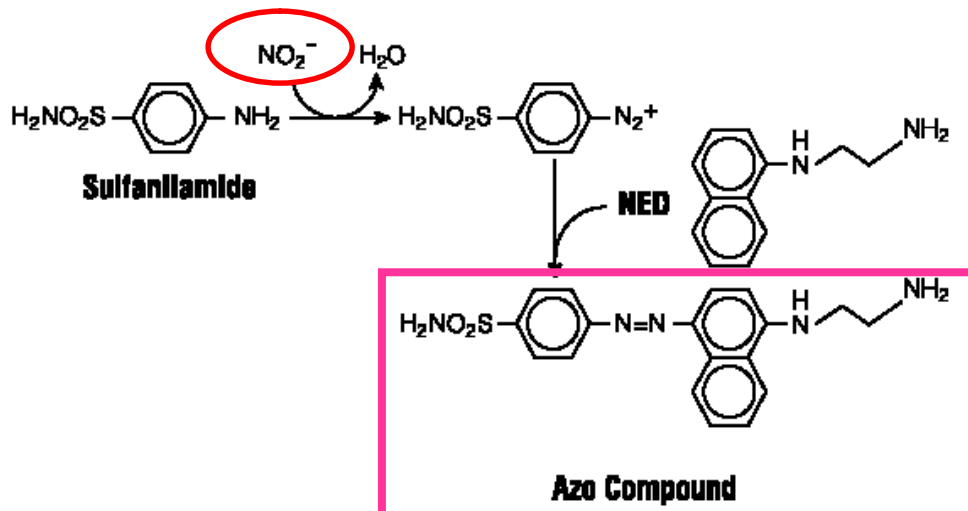


Abb. 18: Darstellung der chemischen Reaktion zum Nachweis von Nitrit mit Hilfe des Griess-Reagenz [38]

4.10 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die analytische Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese besteht aus zwei unterschiedlichen Verfahren zur Trennung der Proteine. Dabei lassen sich die verschiedenen Proteinzustände und Zusammensetzungen innerhalb behandelter und unbehandelter Zellen gut vergleichen. Die Proteine müssen vor der Untersuchung aus den Zellen gewonnen werden. Zum Aufschluss der Zellen wurde ein Harnstoffpuffer, als chemische Methode (Kap. 3.9.5), und Ultraschall, als mechanische Methode, verwendet. Lagen die Proteine vor, begann der erste Schritt der zweidimensionalen Gelelektrophorese. Er wird isoelektrische Fokussierung

(IEF) genannt und trennt die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (PI). Die Proteine werden mittels eines elektrischen Feldes sortiert und in einem Gelstreifen (IPG-Streifen) fixiert. In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen reichte der pH-Bereich von pH3-10. Als zweiter Schritt folgt daran anschließend eine SDS-Gelelektrophorese, in der die Proteine nach ihrer molekularen Masse aufgetrennt werden (Abb. 19). Dies erfolgt durch verlangsamte Wanderungsgeschwindigkeit großer Proteine. Die kleineren Proteine wandern schneller durch die Netzstrukturen des SDS-Gels und sind deswegen eher im unteren Bereich des beendeten Gels zu finden. Durch die Kombination dieser beiden Techniken können auch komplexe Proteingemische von mehreren tausend verschiedenen Proteinen getrennt werden.

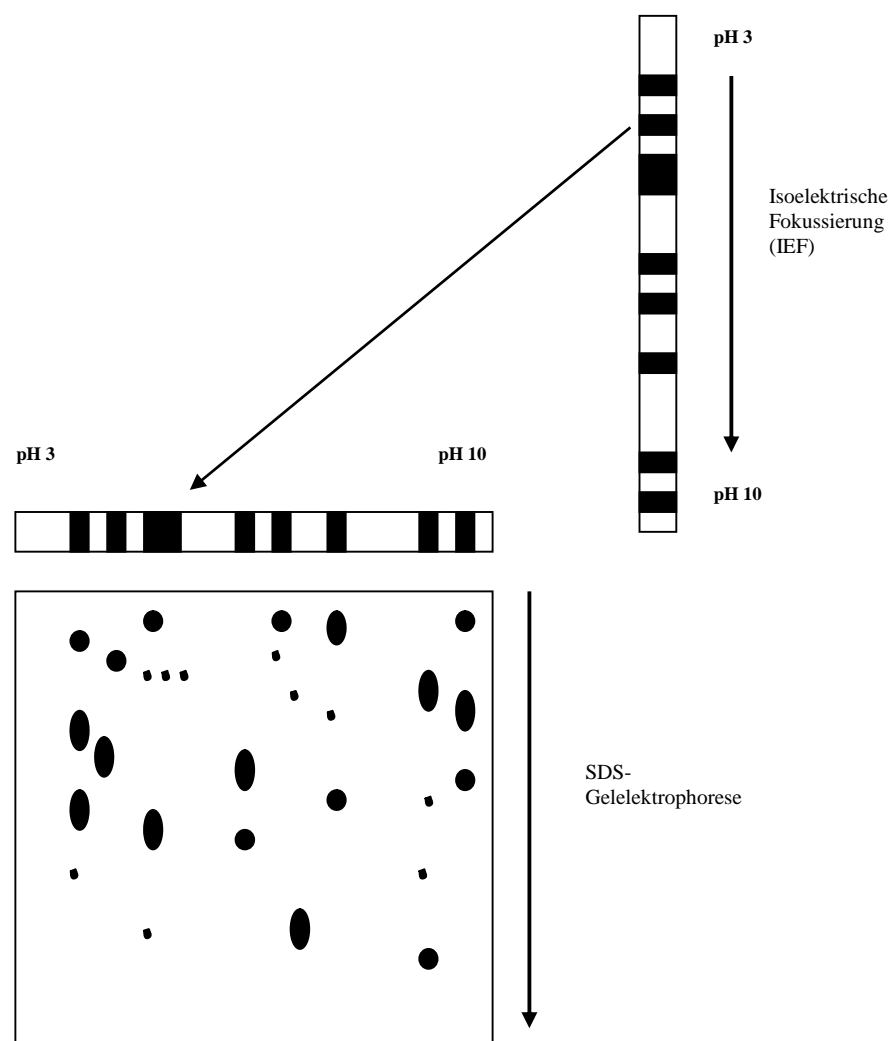


Abb. 19: Schematische Darstellung der zweidimensionalen Gelelektrophorese

4.10.1 Herstellung der SDS-Gele für die zweidimensionale Gelelektrophorese

Bevor die Gele hergestellt werden konnten, musste die Gießkammer (Protean Plus Multi-Casting Chamber) (Abb. 20) vorbereitet werden. Dazu wurden die Glasplatten, zwischen denen die Gele polymerisieren sollten, mit Wasser gesäubert und in die Gießkammer eingelegt. Dabei musste darauf geachtet werden, zwischen die Glasplatten eine Plastikfolie als Spacer einzulegen. Die Gießkammer wurde dicht verschlossen und an den Gießstand angeschlossen. Die Acrylamidlösung wurde laut Protokoll (Kap. 3.9.7) angesetzt und in den Gießstand eingefüllt. Von dort lief die Lösung in die Gießkammer mit den darin enthaltenen Glasplatten. Durch den steigenden Acrylamidpegel füllte sich der Raum zwischen den Glasplatten. Um Acrylamid zu sparen und den angeschlossenen Schlauch nicht zu verstopfen, wurde anschließend an die Acrylamidlösung eine Ausgleichslösung (Kap. 3.9.8) eingefüllt.



Abb. 20: Gießkammer der Protean Plus Serie von BioRad [43]

Etwa einen Zentimeter unterhalb des oberen Endes sollte die Befüllung gestoppt werden. Der Einlauf in die Gießkammer wurde verschlossen und die obere Hälfte der Kammer mit Frischhaltefolie abgedeckt. Die Gele benötigen etwa einen Tag um vollständig auszupolymerisieren. Danach wurden sie aus der Gießkammer entnommen und konnten zwischen den Glasplatten für etwa vier Wochen im Lagerpuffer (Kap. 3.9.) bei 4°C aufbewahrt werden.

4.10.2 Passive Rehydrierung

Um die Proteine in die IPG-Streifen zu überführen wurden diese dem Gefrierschrank entnommen und aufgetaut. Dabei verblieb die Schutzfolie auf den Streifen, um kein Wasser aus der Umgebung aufzunehmen. 330 μ L Proteinlösung (Konzentration etwa 1 mg/mL) im Sample Puffer wurden für die passive Rehydrierung in ein Tray gegeben.

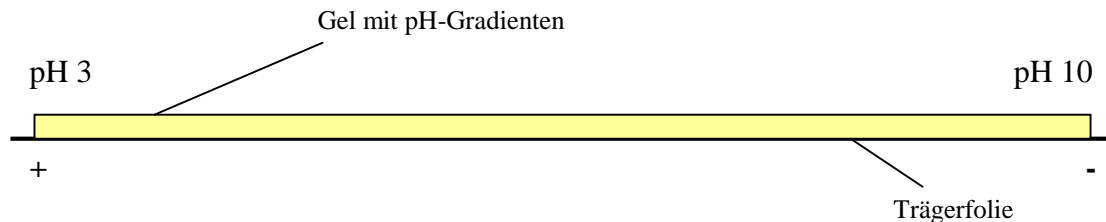


Abb. 21: Schematische Darstellung eines IPG-Streifens (pH 3-10)

Nach Entfernung der Schutzfolie wurden die IPG-Streifen (17cm, pH3-10) (Abb. 21) in diese Lösung gelegt. Dabei zeigte die Gelseite der Streifen in die Proteinlösung. Beim Auflegen sollten Luftblasen vermieden werden, danach wurden die Streifen mit jeweils 1-2 mL Mineralöl überschichtet, um ein Austrocknen während der Rehydrierung zu vermeiden. Die IPG-Streifen wurden über Nacht bzw. für wenigstens 14 Stunden in der Proteinlösung belassen. Anschließend an die passive Rehydrierung wurden die nun aufgequollenen Streifen entnommen und durch Abstreifen der Folienseite an einem Filterpapier vom restlichen Mineralöl befreit. Die Streifen wurden zu isoelektrischen Fokussierung (Kap. 4.10.3) in ein Tray der IEF-Zelle (Abb. 22) überführt.

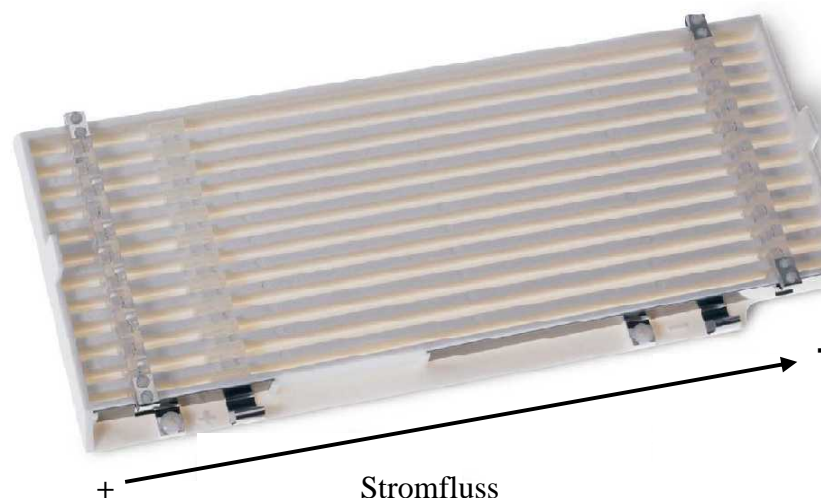


Abb. 22: Gel-Tray der IEF-Zelle der Protean Plus Serie von BioRad [42]

4.10.3 Isoelektrische Fokussierung

Um die Proteine gemäß ihrer Ladung zu separieren wurden schmale Filterpapierstreifen mit MilliQ angefeuchtet und über die Elektroden des Trays für die IEF-Zelle gelegt. Diese Streifen sollten den Stromfluss begünstigen und Salze zurückhalten. Auf diese Streifen wurden die IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten und in Richtung des elektrischen Feldes aufgelegt. Die IPG-Streifen wurden wieder mit Mineralöl überschichtet um ein Austrocknen und Durchschmoren der Streifen zu vermeiden. Der Tray wurde in die IEF-Zelle, ebenfalls in Richtung des elektrischen Feldes, eingelegt und das Programm aus Tabelle 4 eingestellt. Nach den angegebenen Voltstunden schaltete das Gerät auf einen Standbymodus, in dem konstante 500 Volt durch die Streifen geleitet wurden. Nach der isoelektrischen Fokussierung wurden die IPG-Streifen dem Tray entnommen und durch Abstreifen der Folienseite an Filterpapier vom restlichen Mineralöl befreit. Die fokussierten Streifen konnten bei -20°C aufbewahrt oder direkt für die zweite Dimension weiterverwendet werden.

Tabelle 4: Einstellungen zur isoelektrischen Fokussierung

Programm	Einstellung
Preset Method	Rapid Δ V
Rehydration	No
Length of strips	17 cm
S1 program fix	250 Volt für 15 Minuten
S2 program	10.000 Vh
S3 program	99.999 Vh
S4 program (500 Volt nach Ende der Fokussierung)	Yes
How many strips?	Anzahl der Streifen
Enter	Methode startet

4.10.4 Equilibrierung der IPG-Streifen

Bevor die fokussierten IPG-Streifen auf die vorbereiteten SDS-Gele aufgelegt werden konnten, mussten sie equilibriert werden. Die in den IPG-Streifen vorliegenden Proteine besaßen noch ihre Tertiärstruktur, d.h. zwischen den Seitenketten der Proteine lagen noch

verschiedene Bindungen vor, wie Wasserstoffbrücken und Disulfidbindungen. Außerdem trugen die Proteine noch ihre durch die verschiedenen Seitenketten erzeugten Eigenladungen, welche, genau wie die Bindungen, die Wanderung im SDS-Gel behindert hätten. Um diese störenden Effekte auszuschalten, wurden 5 mL des Equilibrierungspuffers (Kap. 3.9.9) in ein 15 ml Falconröhrchen gegeben und darin 200 mg Dithiotreitol (DTT) bzw. in einem zweiten Röhrchen 250 mg Iodoacetamid gelöst. Die IPG-Streifen wurden, entweder frisch oder nach dem Auftauen, in ein Tray gegeben und mit 2 mL Equilibrierungspuffer mit DTT überschichtet und für 15 Minuten bei 200 U/min auf den Schütteltisch gestellt. Dieser Vorgang wurde mit dem Equilibrierungspuffer mit Iodoacetamid wiederholt. DTT sorgte für eine Spaltung der Disulfidbrücken, Iodoacetamid alkyliert die Thiolgruppen und schützt sie vor Reoxidation. SDS lagerte sich an die Proteine an und eliminierte mit seiner stark negativen Ladung die Eigenladung der Proteine, was zu einer gleichmäßigen Wanderungsrichtung nach Proteinmasse im SDS-Gel führte. Nach diesen zwei Schritten wurden die IPG-Streifen auf die vorbereiteten SDS-Gele aufgelegt.

4.10.5 Zweite Dimension der 2D-Gelelektrophorese

Der an die Gelkammer angeschlossene Wasserkühler musste vor Beginn der Gelelektrophorese auf 10°C heruntergekühlt werden um der durch den Stromfluss entstehenden Wärme entgegen zu wirken.

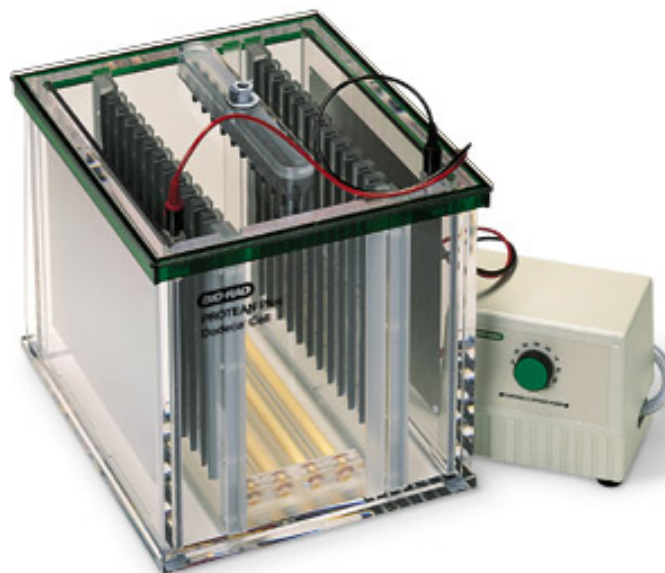


Abb. 23: Protean Plus Dodeca Cell der Firma BioRad [43]

Die equilibrierten IPG-Streifen wurden möglichst blasenfrei auf die vorbereiteten SDS-Gele aufgelegt und mit 1,5 %iger Agarose überschichtet um den IPG-Streifen an Ort und Stelle zu halten. Die Agarose (Kap. 3.9.11) wurde dazu in der Mikrowelle erwärmt bis sie wieder flüssig wurde. Die Gelkassetten wurden nun in die Gelkammer eingelegt. Der Deckel der Gelkammer (Abb. 23) wurde aufgesetzt, die Wasserzirkulation (100 %) angeschaltet und der Stromfluss gestartet. Die angelegte Spannung lag dabei zwischen 100 und 130 Volt und beschränkte die Laufzeit der SDS-Gele auf 19 bzw. 16 Stunden. Dabei diente das sowohl in den IPG-Streifen als auch in der Agarose vorliegende Bromphenolblau als Markierung, da es auf Höhe der kleinsten Proteine mitlief. Hatte diese Markierung das untere Ende des Gels erreicht, war die Elektrophorese beendet und die Gele konnten entnommen werden. Darauf folgte eine Fixierung und Färbung der Gele.

4.10.6 Fixierung und Färbung der 2D-Gele

Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele in die Fixierlösung (Kap. 3.9.12) gegeben und blieben dort für eine Stunde. Nach dieser Zeit wurden die Gele in die angefertigte Coomassie Brilliant Blue Färbelösung (Kap. 3.9.13) überführt und über Nacht in dieser Lösung belassen. Am nächsten Tag wurde die Färbelösung abgenommen und der Hintergrund mit mehrmaligem Waschen mit MilliQ wieder entfärbt. Danach konnten die Gele mit Hilfe des Densitometers GS-800 eingescannt werden.

5. Ergebnisse

5.1 Wachstumskurve

Um eine Wachstumskurve für die Zelllinie RAW 264.7 zu erstellen, wurden die Zellen für sechs Tage bei 37°C und 10 % CO₂-Begasung in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm² der Firma Falcon kultiviert. Jeweils täglich wurde von drei parallel angesetzten Zellkulturflaschen die Zellzahl bestimmt. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Neubauer improved Zählkammer (Kap. 4.1).

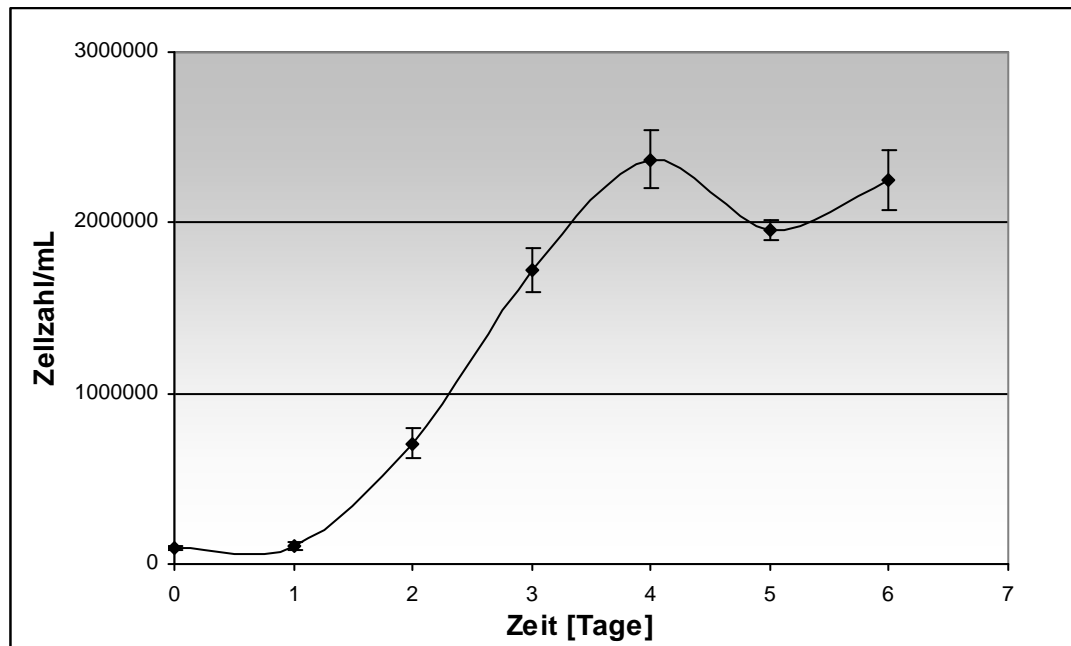


Abb. 24: Wachstumskurve der Kultivierung der Zelllinie RAW 264.7

Aus Abbildung 24 lässt sich erkennen, dass die Zellzahl etwa bis zum vierten Tag anstieg und dann in eine Sättigung übergang. Die maximale Zellzahl, die bei dieser Kultivierung erreicht werden konnte, betrug dabei $2,3 \times 10^6$ Zellen/mL. Parallel durchgeführte Proteinbestimmungen zeigten, dass die Proteinkonzentration der geernteten Zellen im gleichen Maße anstieg (Abb. 25). Die Proteinbestimmungen erfolgten mit Hilfe des BioRad Protein Assays (Kap. 4.4). Die Höchstwerte lagen dabei nach vier bzw. fünf Tagen der Inkubation etwa bei 2 mg/mL Protein. Dies korrelierte mit der Beobachtung, dass zu diesem Zeitpunkt die Zellzahl ebenfalls den höchsten Wert erreichte. In Tabelle 5 ist die Proteinmenge pro Zelle dargestellt.

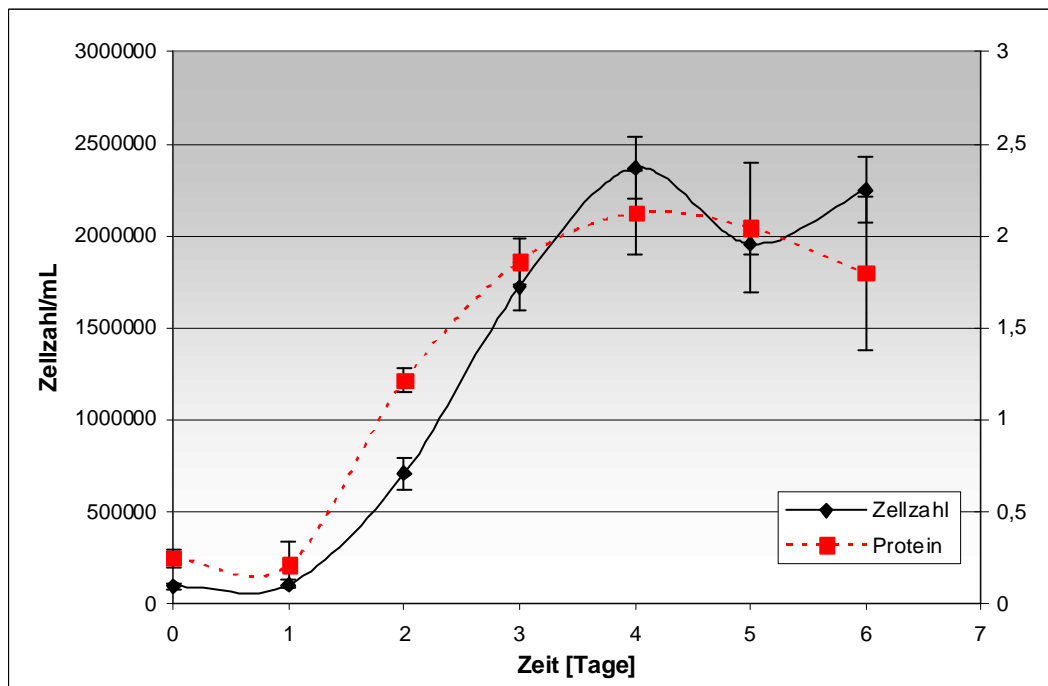


Abb. 25: Vergleich von Zellzahl und Proteinmenge der Zelllinie RAW 264.7

Tabelle 5: Proteinmenge pro Zelle an den verschiedenen Versuchstagen

Tag der Wachstumskurve	Proteinmenge (ng) pro Zelle
Tag 0	2,625
Tag 1	2,027
Tag 2	1,710
Tag 3	1,080
Tag 4	0,896
Tag 5	1,045
Tag 6	0,799

Dabei zeigte sich, dass die Proteinmenge zu den verschiedenen Zeitpunkten variierte und nicht konstant blieb. Die Werte unterlagen dabei auch starken Schwankungen (Werte nicht dargestellt) wie schon aus Abbildung 25 zu erkennen war.

Zusätzlich zu den Bestimmungen der Zellzahl und des Proteingehaltes wurden die Zellen auch mikroskopisch betrachtet. Dazu wurden Aufnahmen der Zellkulturen bei 10facher bzw. 40facher Vergrößerung gemacht (Abb. 26 und 27). Die mikroskopische Darstellung der Zellen während des Wachstums zeigte die deutliche Zunahme der Zellzahl im Vergleich vom ersten zum dritten Tag der Kultivierung.

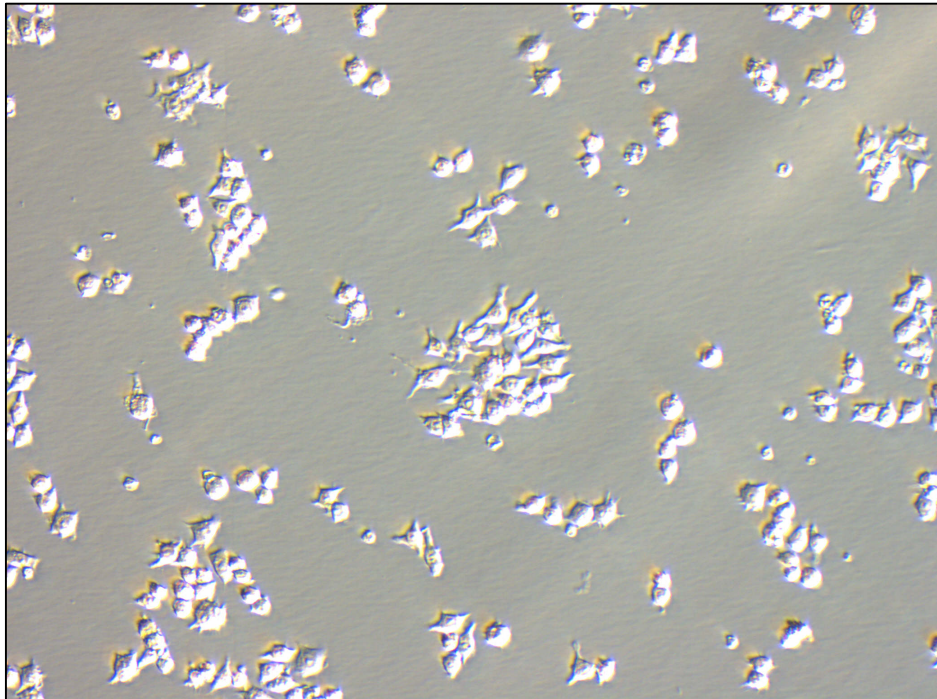


Abb. 26: RAW 264.7-Zellen am ersten Tag des Wachstums bei 10facher Vergrößerung

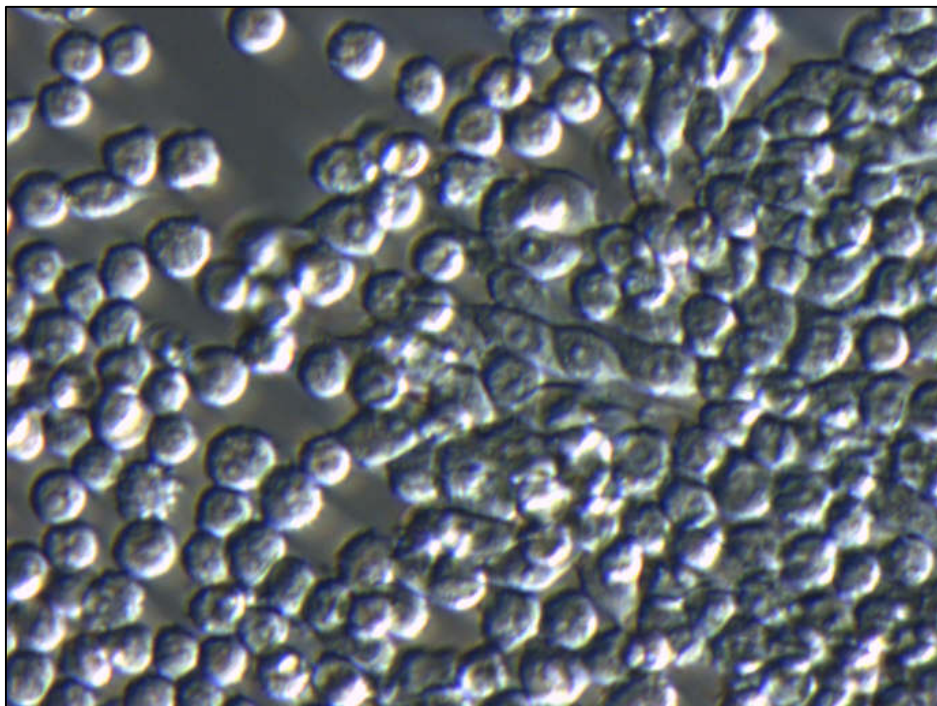


Abb. 27: RAW 264.7-Zellen am dritten Tag des Wachstums bei 40facher Vergrößerung

Nach vier Tagen Wachstum gab es kaum noch unbewachsene Stellen am Boden der Zellkulturflaschen, die Konfluenz der Zellen war nahezu erreicht. Die weitere mikroskopische

Beobachtung zeigte, dass die Zellen sich etwa ab dem fünften Tag der Kultivierung zunehmend vom Boden ablösten. Sie verloren dabei ihre charakteristische Form und kugelten sich im Medienüberstand zusammen. Da auch der Proteingehalt der Proben nicht weiter anstieg, wurden die Zellen für die Versuche zur Inkubation mit den Naturstoffen und zur zweidimensionalen Gelelektrophorese (Kap. 5.7) bis zur Konfluenz kultiviert und mit den Substanzen behandelt.

5.2 Einfluss auf das Wachstum der Zelllinie RAW 264.7

Die untersuchten Substanzen sollten jeweils in einer für die Zellen nicht toxischen Konzentration verwendet werden. Um diese Konzentrationen zu ermitteln, wurden die Zellen über die Zeiträume von 30 Minuten, 2 Stunden, 18 Stunden, 70 Stunden sowie über 5 Tage mit verschiedenen Konzentrationen der Substanzen in 96-well Mikrotiterplatten inkubiert und dann mit Hilfe des WST-Tests (Kap. 4.6) auf ihre Vitalität getestet. Alle Werte wurden dabei auf die niedrigste Substanzkonzentration normiert. LPS wurde als Standard-Stimulans verwendet und sollte in den späteren Versuchen, wie die anderen Substanzen, etwa in einer halbmaximalen Konzentration (IC_{50}) eingesetzt werden.

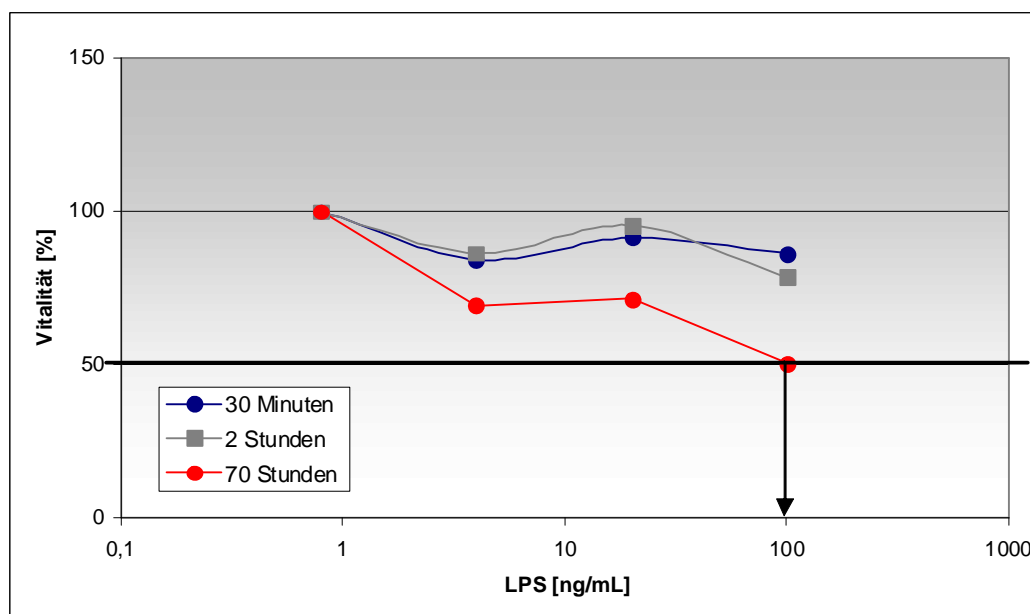


Abb. 28: Einfluss der Inkubationszeit auf die Toxizität von LPS

Der mit Hilfe dieses Tests ermittelte IC_{50} -Wert lag bei einer 70 stündigen Inkubation bei etwa 100 ng/mL (Abb. 28) und wurde in allen weiteren Versuchen als Standardkonzentration zur Stimulation der Zellen verwendet. Der Kurvenverlauf ließ vermuten, dass höhere Konzentrationen einen toxischen Effekt zeigen würden. Nach kürzeren Inkubationszeiten von 2 Stunden bzw. 30 Minuten wurden nahezu keine toxischen Effekte beobachtet. Disorazol A, Epothilon B, Vioprolid A, Tubulysin A und Purvalanol B wurden ebenfalls auf ihre Toxizität gegenüber den Makrophagen getestet.

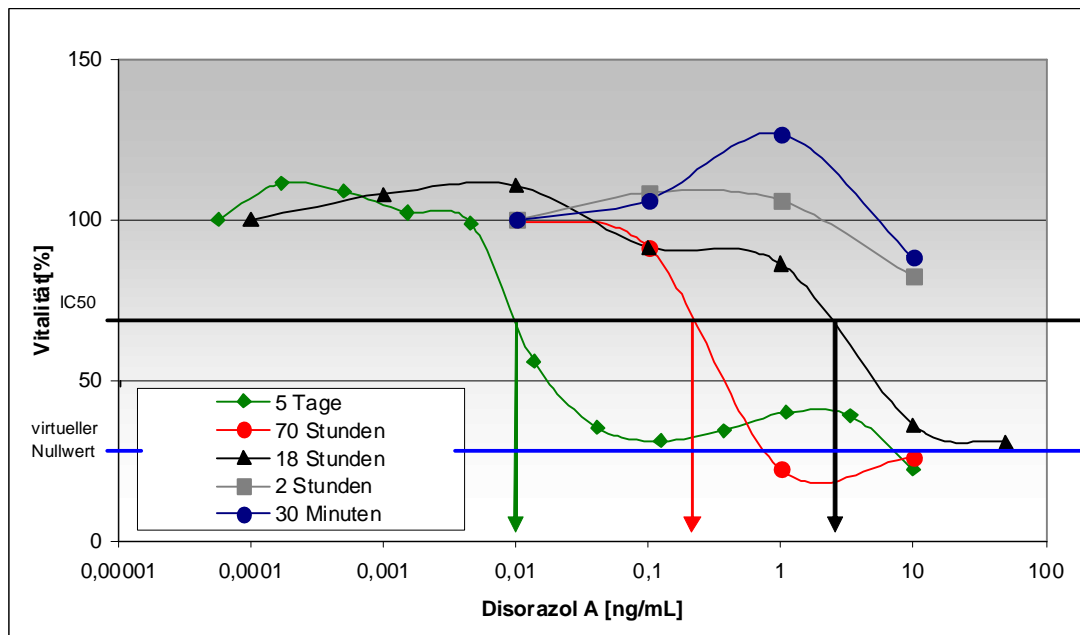


Abb. 29: Einfluss der Inkubationszeit und der Konzentration auf die Toxizität von Disorazol A

Da die Werte nach 5 Tagen nicht auf das Hintergrundniveau zurückgingen, wurde ein virtueller Nullwert eingeführt (blaue Linie) und der IC_{50} anhand der Differenz zum 100 % Wert bestimmt. Die Kurvenverläufe für die Messungen nach 5 Tagen, 70 und 18 Stunden zeigten dabei den typischen Verlauf von Vitalitätsbestimmungen und ermöglichten eine Bestimmung der halbmaximalen Hemmkonzentration. Der ermittelte IC_{50} -Wert für Disorazol A lag nach 18 Stunden bei etwa 4 ng/mL, nach 70 Stunden bei etwa 300 pg/mL und nach 5 Tagen bei etwa 10 pg/mL (Abb. 29). Für die beiden kürzeren Inkubationszeiten von 30 Minuten und 2 Stunden konnte anhand der vorliegenden Werte keine Toxizität festgestellt werden.

Bei Epothilon B wiesen die Graphen ebenfalls einen typischen Verlauf auf. Die 18 Stunden Messung fiel nicht wie erwartet stark ab, erreichte aber ebenfalls das 50 % Niveau. Daraus ergab sich ein IC_{50} -Wert von etwa 100 ng/mL nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden, von etwa 3 ng/mL nach 70 Stunden und von etwa 400 pg/mL nach 5 Tagen. Eine Inkubationszeit von 2 Stunden führte zu keinem toxischen Effekt (Abb. 30). Der Verlauf der 30 Minuten Inkubation zeigte einen ungewöhnlichen Verlauf und stieg nach einem relativ starken Abfall leicht wieder an, blieb allerdings auch oberhalb der 50 % Grenze.

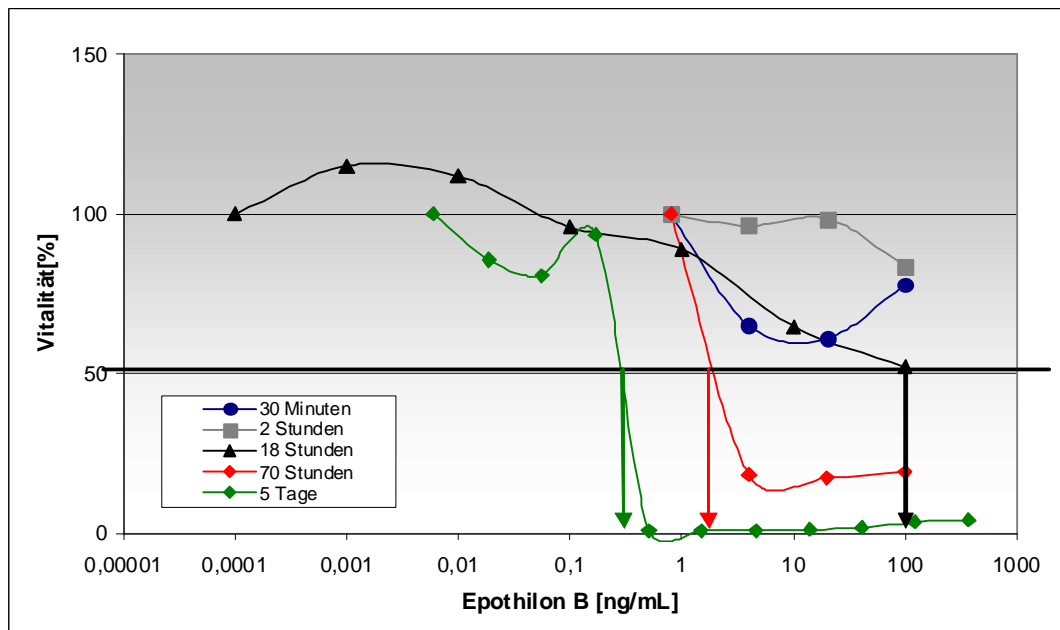


Abb. 30: Einfluss der Inkubationszeit und der Konzentration auf die Toxizität von Epothilon B

Die Messungen für Vioprolid zeigten nur für Inkubation von 5 Tagen einen erwarteten Verlauf. In diesem Fall ließ ein IC_{50} -Wert von etwa 8,5 ng/mL ermitteln (Abb. 31).

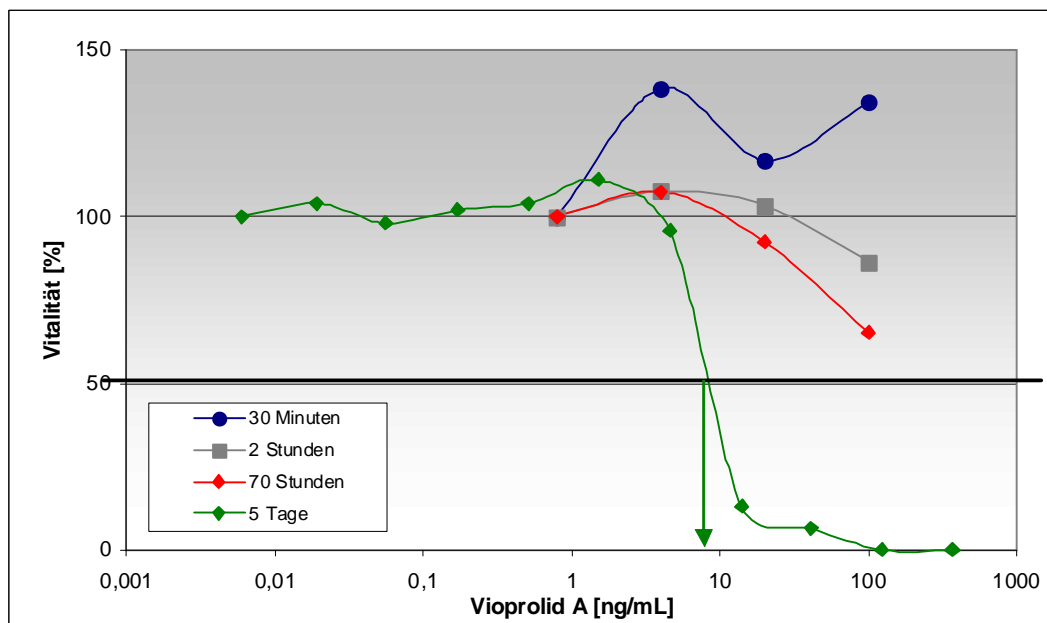


Abb. 31: Einfluss der Inkubationszeit und der Konzentration auf die Toxizität von Vioprolid

Für die restlichen Zeitpunkte konnten keine IC_{50} -Werte ermittelt werden, da die Messungen im verwendeten Konzentrationsbereich oberhalb einer halbmaximalen Hemmung lagen. Eine toxische Wirkung auf die Zellen war für diese Zeitpunkte nicht nachweisbar, die

Kurvenverläufe (2 und 70 Stunden) legten jedoch den Schluss nahe, dass höhere Konzentrationen der Substanz zu diesem Zeitpunkten einen toxischen Effekt zeigen würden. Die mit Tubulysin A durchgeführten Versuche stellten die halbmaximale Hemmung des Zellwachstums nach 18 Stunden bei etwa 100 ng/mL und nach 5 Tagen bei etwa 100 pg/mL dar (Abb. 32). Für die restlichen Inkubationszeiten konnte kein IC_{50} -Wert bestimmt werden, da die Messungen nicht unterhalb die 50 % Marke sanken. Die Messung nach 70-stündiger Inkubation zeigte einen ähnlich ungewöhnlichen Verlauf wie die 30 Minuten Messung bei Disorazol.

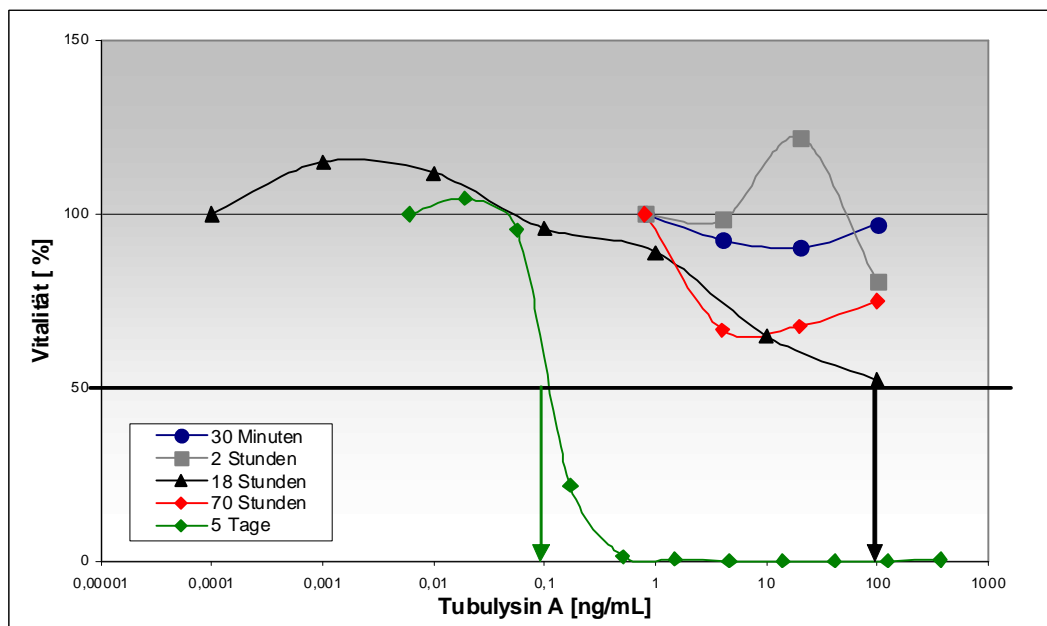


Abb. 32: Einfluss der Inkubationszeit und der Konzentration auf die Toxizität von Tubulysin A

Als letzte Substanz sollte der kommerzielle Kinaseinhibitor Purvalanol B auf seine Toxizität getestet werden. Im untersuchten Konzentrationsbereich zeigte sich kein toxischer Effekt durch Purvalanol B, die Wachstumshemmung lag bei nur etwa 10-20 %. Im Gegensatz zu den übrigen verwendeten Substanzen zeigte sich auch nach einer längeren Einwirkzeit von fünf Tagen kein wachstumshemmender Effekt der Substanz. Lediglich die höchste Konzentration von 370 ng/mL zeigte einen geringen Effekt bezogen auf die anderen Konzentrationen. Die Toxizität des Inhibitors insgesamt lag jedoch nur bei etwa 10-20 % (Abb. 33).

Resultierend aus den vorliegenden Ergebnissen, und im Falle des LPS auch Bezug nehmend auf Literaturangaben [76], wurden in den folgenden Untersuchungen die Konzentrationen der Substanzen zur Behandlung der Makrophagen aus einem nicht toxischen Bereich verwendet. Die Endkonzentration von LPS lag dabei bei 100 ng/mL und betrug somit genau die

halbmaximale Hemmkonzentration. Tabelle 6 zeigt die für die Substanzen gewählten Endkonzentrationen, welche in den folgenden Untersuchungen verwendet wurden. Die Endkonzentration für Purvalanol B wurde auf 100 ng/mL festgesetzt.

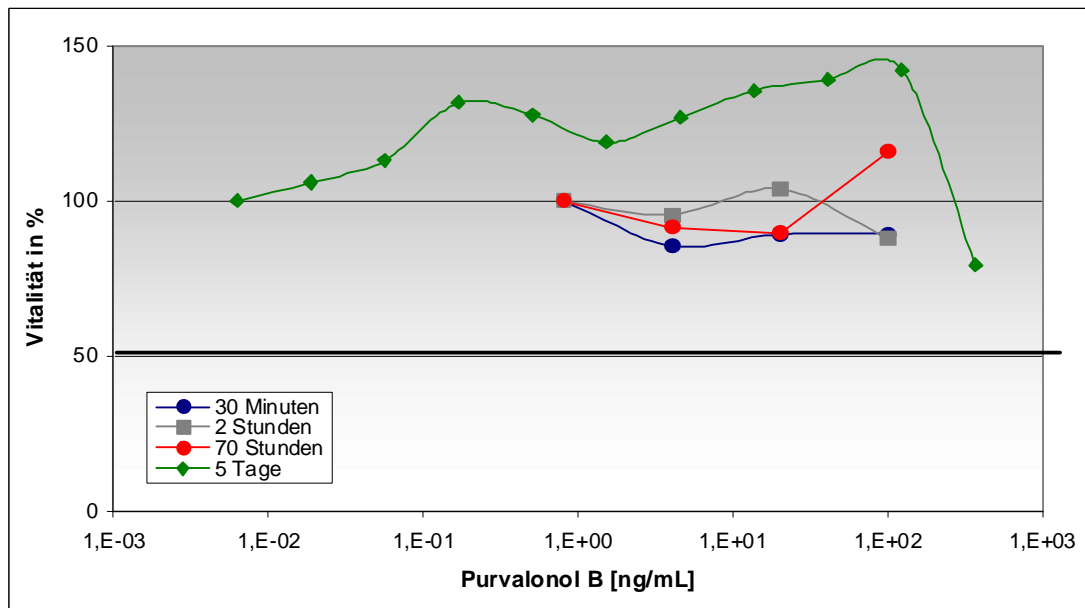


Abb. 33: Einfluss der Inkubationszeit und der Konzentrationen auf die Toxizität von Purvalanol B

Tabelle 6: Endkonzentrationen der verwendeten Substanzen

Substanz	Endkonzentration
LPS	100 ng/mL
Epothilon B	100 ng/mL
Tubulysin A	100 ng/mL
Vioprolid A	500 ng/mL
Disorazol A	10pg/mL bzw. 100 pg/mL
Purvalanol B	100 ng/mL

5.3 Nachweis von Stickstoffmonoxid als Mediator der Immunantwort

Stickstoffmonoxid (NO) wird von Makrophagen als Reaktion auf eine Stimulation gebildet und ins Zellkulturmedium abgegeben. Dort reagiert es innerhalb weniger Sekunden mit dem umgebenden Sauerstoff zu Nitrit bzw. Nitrat [37]. Nitrit kann mit Hilfe der Griess-Reaktion detektiert werden (s. 4.9). Die Bildung des NO kann laut Literaturangaben [55] mit dieser Methode am effektivsten nach 18- 24 Stunden nachgewiesen werden.

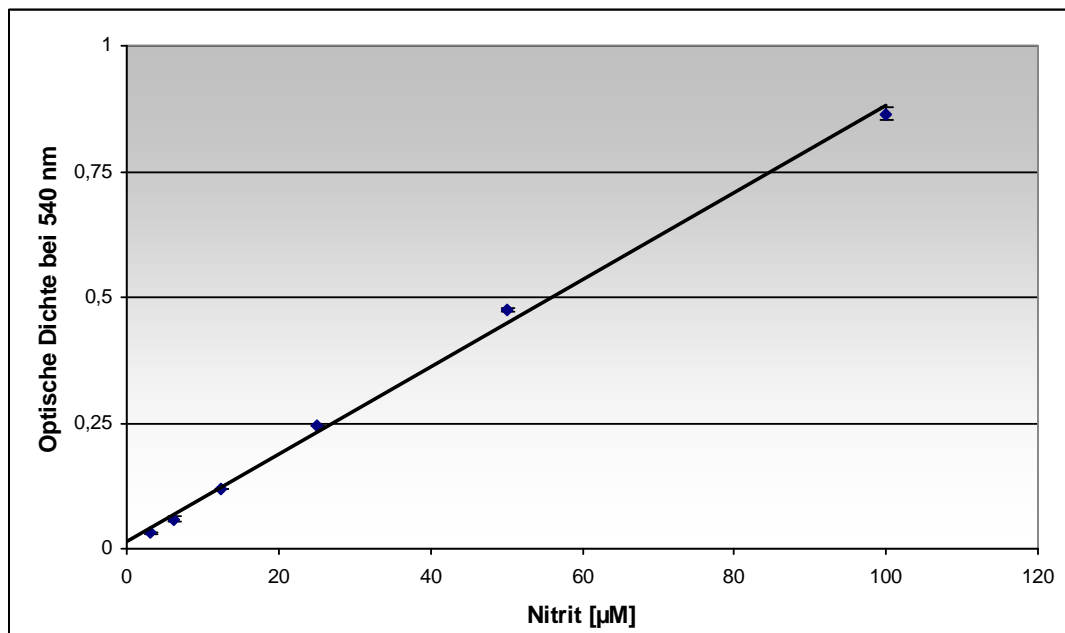


Abb. 34: Kalibriergerade für den Nachweis von Nitrit mit Hilfe des Griess-Reagens

Die mit Natriumnitrit erzeugte Kalibriergerade (Abb. 34) wurde verwendet, um den Nitritgehalt der Medienüberstände der behandelten Zellen zu bestimmen. Der gewählte Zeitpunkt lag bei den folgenden Experimenten, sofern nicht anders vermerkt, bei 18 Stunden Inkubation mit den Substanzen. Die Inkubation fand bei 37°C und 10 %iger CO₂-Begasung statt. Zur Messung des NO-Gehalts wurde der Medienüberstand abgenommen, mit dem Griess-Reagenz 1:1 gemischt und bei 540 nm in µQuant Spektralphotometer vermessen. Dabei wurden jeweils die einzelnen Substanzen, die Substanzen in Kombination mit LPS und die Zeit- bzw. Konzentrationsabhängigkeit der NO-Bildung untersucht.

5.3.1 Nachweis von NO nach Stimulation der Zellen

Als zusätzliches Standard-Stimulans wurde das aus Literaturangaben bekannte Glycoprotein Interferon γ (IFN- γ) aufgenommen und in einer Endkonzentration von 100 ng/mL verwendet. In der angegebenen Literatur [48] wird Interferon γ bezogen auf die Stickstoffmonoxidbildung der Makrophagen als positiv wirkend, beschrieben.

Tabelle 7: Nitritkonzentration nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen

Substanz	Endkonzentration der Substanz	Nitritkonzentration
LPS	100 ng/mL	~ 10-40 μ M
Interferon γ	100 ng/mL	~ 10 μ M
Epothilon B	1 μ g/mL und 100 ng/mL	0 μ M
Vioprolid A	500 ng/mL	2-3 μ M
Tubulysin B	100 ng/mL	1-3 μ M
Disorazol A	10 pg/mL und 100 pg/mL	0 μ M

Lediglich für die Stimulation der Zellen mit LPS und Interferon γ (Tab. 7) konnte eine starke Nitritbildung nachgewiesen werden. Die verhältnismäßig niedrigen Nitritmengen bei Vioprolid A bzw. Tubulysin A lagen im Bereich von 1-3 μ M, was an der unteren Nachweisgrenze liegt und somit nur begrenzt aussagekräftig ist. Bei den weiteren Substanzen konnte Nitrit nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich zu Stimulationen mit festgelegten Konzentrationen wurden konzentrationsabhängige (Kap. 5.3.2), zeitabhängige (Kap. 5.3.3) und mit LPS kombinierte (Kap. 5.3.4) Messungen durchgeführt.

5.3.2 Konzentrationsabhängigkeit der Stickstoffmonoxidbildung nach Stimulation

Der Einfluss der Konzentration der verwendeten Stimulans auf die Bildung von NO bzw. die Bildung von Nitrit sollte mit Hilfe der Standard-Stimulantien LPS und Interferon γ getestet werden. Dazu wurden die Zellen der Zelllinie RAW 264.7 in 96-well Mikrotiterplatten bis zur Konfluenz kultiviert und mit den entsprechenden Substanzen für 18 Stunden behandelt. Stellvertretend soll hier nur der Einfluss der Konzentrationsabhängigkeit der Reaktion auf Interferon γ und LPS dargestellt werden. Zusätzlich zu der Stimulation der Zellen mit Interferon γ bzw. LPS in einem Bereich von etwa 100 pg/mL bis 30 μ g/mL wurde auch eine Kombination mit dem Kinaseinhibitor Purvalanol B und Interferon γ bzw. eine Kontrolle mit dem Kinaseinhibitor allein verwendet.

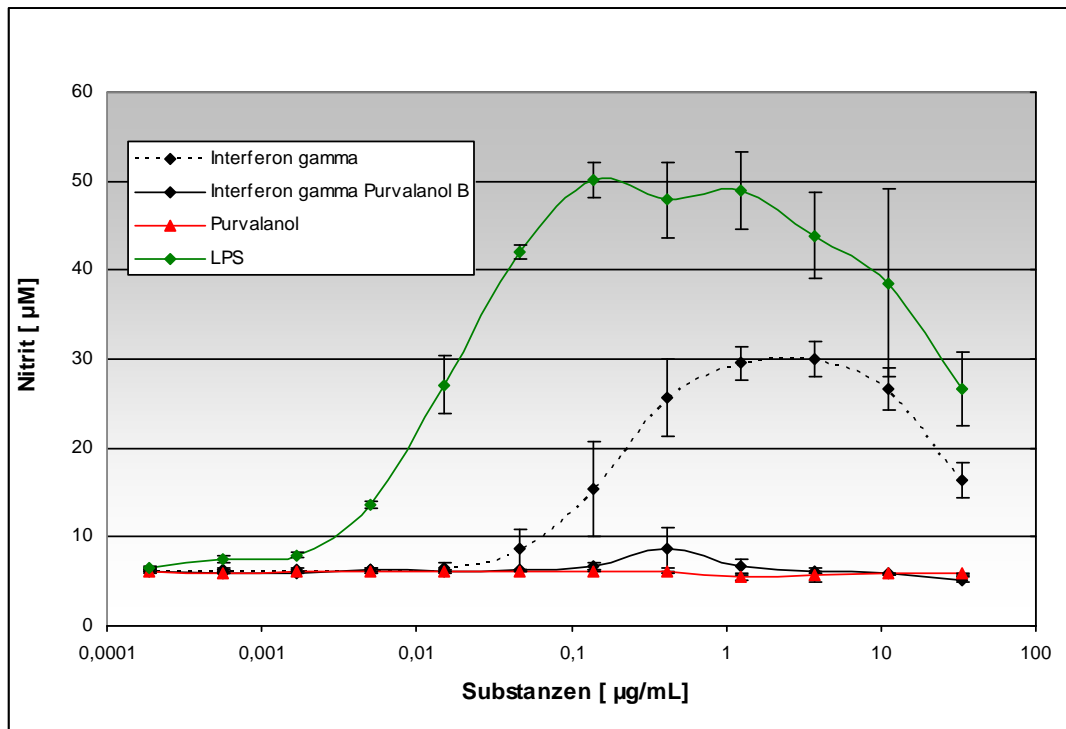


Abb. 35: Konzentrationsabhängigkeit nach Stimulation mit LPS bzw. Interferon γ und Purvalanol B

Aus Abbildung 35 geht hervor, dass die Nitritbildung der Zellen nach Stimulation mit IFN- γ bzw. LPS eindeutig konzentrationsabhängig war. Die höchsten Nitritkonzentrationen wurden dabei in einem Konzentrationsbereich von 1 und 10 $\mu\text{g/mL}$ für Interferon γ und von etwa 50 bis 1000 ng/mL für LPS erreicht. Erneut wurde deutlich, dass die Stimulation der Zellen mit LPS zu höheren Nitritmengen führte als die Behandlung mit Interferon γ . Die Kombination mit Purvalanol führte zu Nitritwerten, welche bis auf das Niveau des Hintergrunds zurückgingen.

Neben LPS und IFN- γ wurden auch die anderen Substanzen auf eine Konzentrationsabhängigkeit bei der Bildung von Stickstoffmonoxid getestet. Die unterschiedlichen Konzentrationen führten allerdings zu keiner Steigerung in der Produktion des Mediators NO. Die gemessenen Nitritmengen lagen dabei auf Hintergrundniveau.

5.3.3 Zeitabhängigkeit der Stickstoffmonoxidbildung

Zusätzlich zum Einfluss der Konzentration wurde der Einfluss der Inkubationszeit der Verbindungen getestet. Als Beispiel sollen hier die Ergebnisse der beiden Stimulantien LPS und Interferon γ gezeigt werden. Aus Abbildung 36 ist zu erkennen, dass NO mit Hilfe der Griess-Reaktion in den ersten sechs Stunden nach der Zugabe der Substanzen nicht

nachweisbar war, sondern erst nach einer längeren Inkubationszeit, in diesem Fall nach 24 Stunden. Es zeigte sich in allen in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten, dass LPS eine stärkere Reaktion der Zellen auslöste, als IFN- γ und alle anderen verwendeten Substanzen.

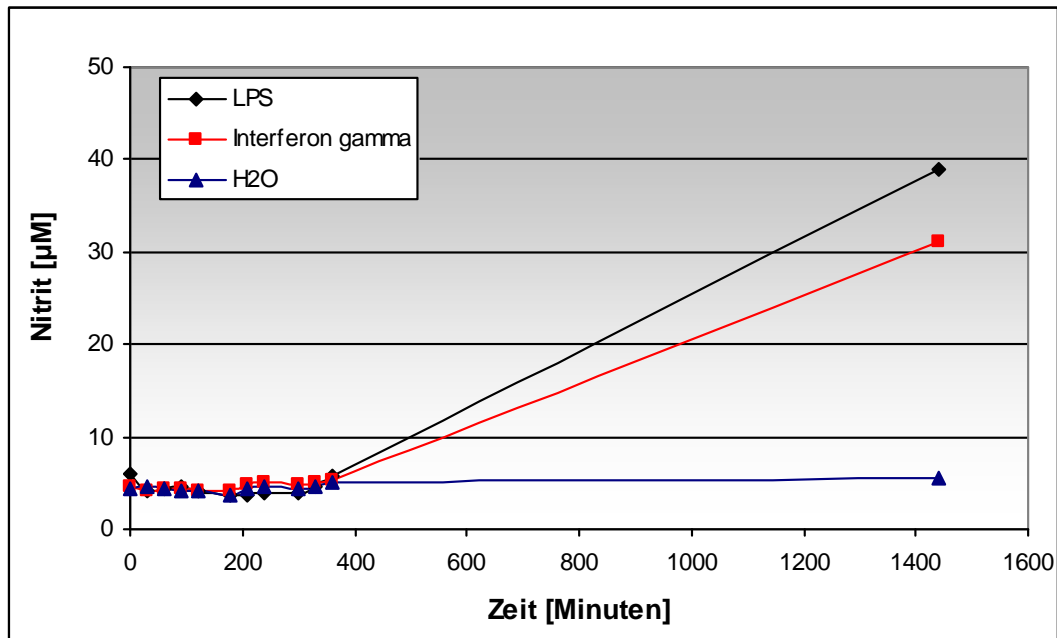


Abb. 36: Zeitabhängigkeit der Nitritbildung nach Inkubation mit LPS und IFN- γ

Die weiteren Substanzen Epothilon B, Vioprolid A, Tubulysin A, Disorazol A und Purvalanol B zeigten wie in den bereits vorangegangenen Experimenten keinen Anstieg der Nitritkonzentration (Daten nicht gezeigt).

5.3.4 Kombination der Substanzen mit LPS

Neben der Behandlung der Zellen mit den einzelnen Substanzen wurden diese auch mit LPS kombiniert, um eventuelle synergistische bzw. inhibierende Wirkungsweisen zu überprüfen. Dazu wurden die Zellen in 96-well Platten bis zur Konfluenz kultiviert und mit verschiedenen Konzentrationen der zu testenden Substanzen bzw. in einigen Ansätzen in Kombination mit 100 ng/mL LPS für 18 Stunden inkubiert. Der Nachweis des gebildeten Stickstoffmonoxids erfolgte mit Hilfe des Griess-Reagenz. Während Disorazol bzw. Epothilon allein keine NO-Bildung induzierten, zeigte sich eine leicht hemmende Wirkung der Substanzen auf die durch LPS ausgelöste Stickstoffmonoxidbildung in den Konzentrationen 20 und 100 ng/mL Epothilon bzw. 10 und 1 ng/mL Disorazol (Abb. 37).

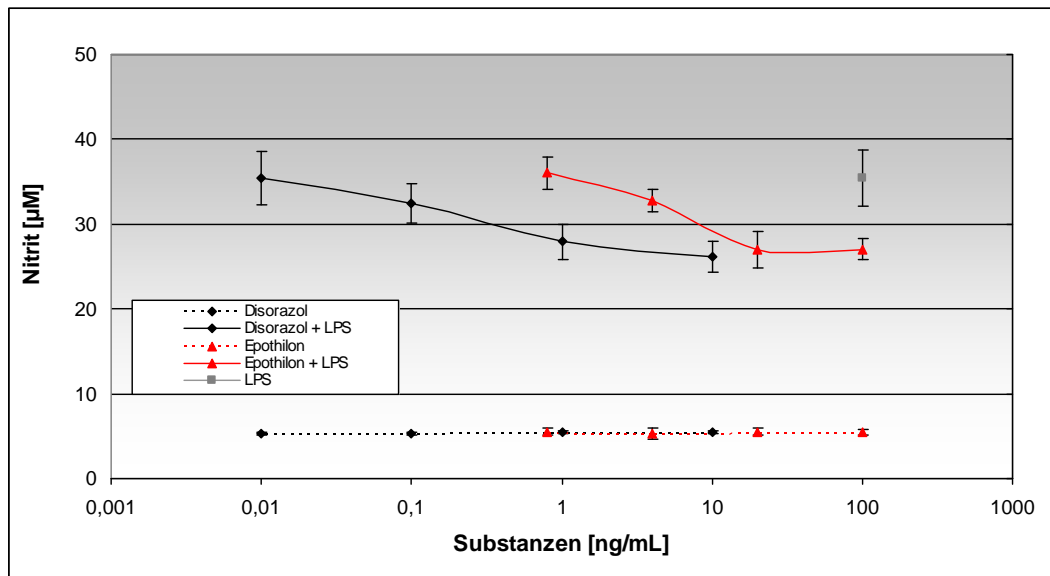


Abb. 37: Nitrit nach Inkubation der Zellen mit Disorazol A und Epothilon B und der Kombination mit LPS (100 ng/mL)

Dieser Effekt ließ sich auch bei der Kombination von Vioprolid und LPS, jedoch nicht bei der Kombination von Tubulysin mit LPS nachweisen (Abb. 38). Die beiden Substanzen allein führten zu keiner Veränderung in der Produktion von Stickstoffmonoxid. Lediglich in der Kombination von Vioprolid A mit LPS zeigte sich, ähnlich wie bei der Behandlung mit Disorazol A und Epothilon B eine hemmende Wirkung der Substanz in der höchsten verwendeten Konzentration (100 ng/mL).

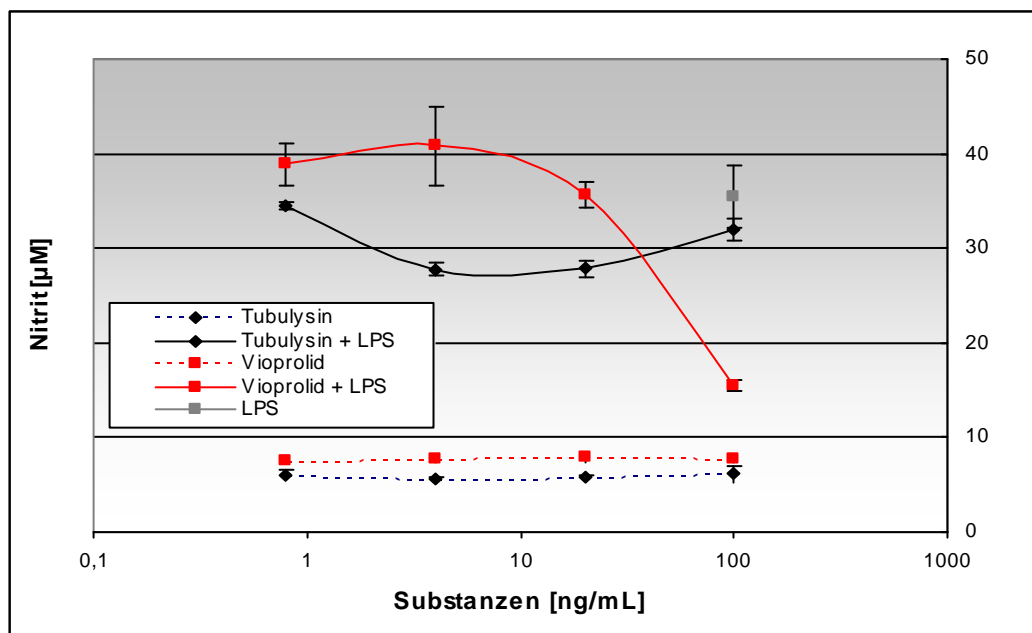


Abb. 38: Nitrit nach Behandlung der Zellen mit Tubulysin und Vioprolid und der Kombination mit LPS (100 ng/ml)

Der Toxizitätstest von Purvalanol B ließ nicht darauf schließen, dass die Substanz einen toxischen Effekt auf die Zellen hatte. Der Hersteller des kommerziellen Kinaseinhibitors gab jedoch an, dass die Substanz einen Einfluss auf den Zellzyklus bzw. die daran beteiligten Kinasen besaß [73]. Um die Wirkung des Inhibitors auf die Immunantwort der Makrophagen auf eine einfache Art zu überprüfen, wurde die Stimulation der Zellen mit LPS bzw. mit Interferon γ in Gegenwart von Purvalanol B durchgeführt. Dazu wurden die Zellen bei 37°C und 10% CO₂ für vier Tage in 10 mL DME-Medium in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm² kultiviert und für 18 Stunden mit den jeweiligen Substanzen behandelt. Die Bestimmung des Nitritgehalts im Überstand erfolgte mit Hilfe der Griess-Reaktion. Um toxische oder stimulatorische Effekte des Lösemittels auszuschließen wurde zusätzlich als Kontrolle DMF bzw. H₂O zur Stimulation der Zellen verwendet.

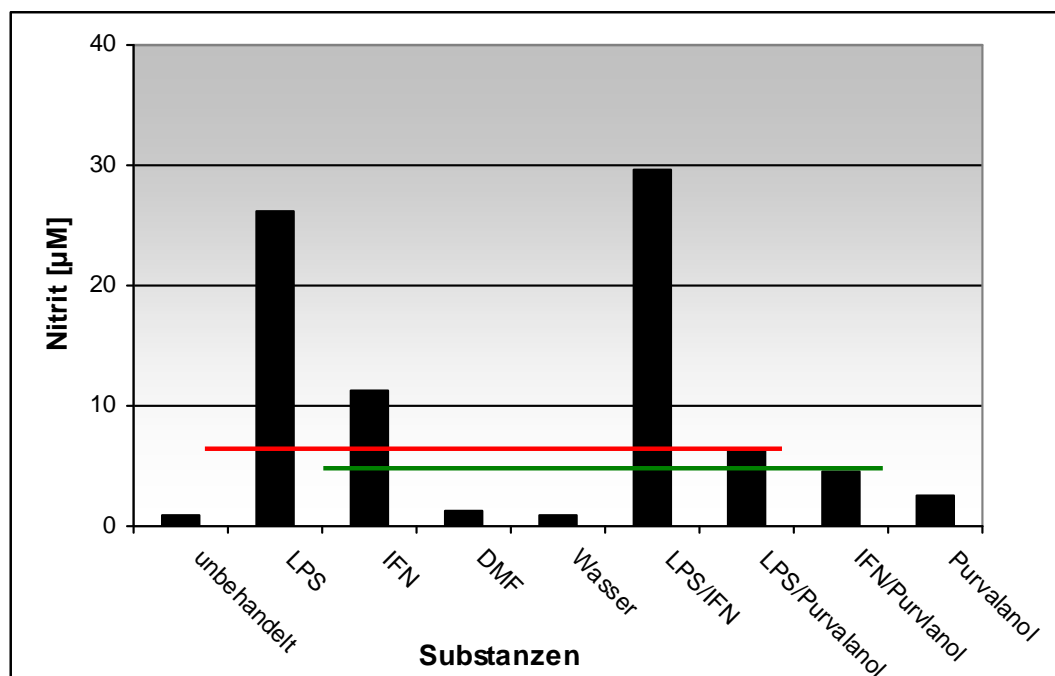


Abb. 39: Nitritbildung nach Inkubation der Zellen mit LPS und Interferon γ bzw. der Kombination mit Purvalanol B

Die Behandlungen mit LPS (100 ng/mL) bzw. Interferon γ (100 ng/mL) zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen einen deutlichen Anstieg (Abb. 39) in der Produktion des Stickstoffmonoxids bzw. der darauf folgenden Reaktion zu Nitrit. Purvalanol B (100 ng/mL) alleine hatte keinen steigernden Effekt auf die NO-Produktion. In Kombination mit LPS bzw. Interferon γ zeigte sich jedoch deutlich eine hemmende Wirkung des Kinaseinhibitors (s. a. Abb.35). Die erreichten Nitritkonzentrationen lagen für LPS bei etwa 26 µM und für Interferon γ bei etwa 11 µM. Die Kombination aus LPS und Purvalanol B ergab nur noch

etwa 25 % des Nitritgehaltes im Vergleich zur Stimulation ausschließlich durch LPS. Bei der Behandlung mit Interferon γ fiel die Hemmung etwas weniger deutlich aus, die Werte gingen hier auf etwa 40 % der ursprünglichen Nitritkonzentration zurück und lagen damit am Detektionslimit.

5.4 Nachweis von TNF- α nach Stimulation der Zellen

Makrophagen produzieren neben NO auch Cytokine als Reaktion auf eine Stimulation. Aus diesem Grund wurde, parallel zum Nachweis von Stickstoffmonoxid, mit Hilfe der ELISA-Technik die Sekretion des TNF- α in das Zellkulturmedium nachgewiesen. Dabei wurde erneut LPS und Interferon γ als Standardstimulation in der Endkonzentration von 100ng/mL gewählt. Außerdem wurden die Zellen mit den Verbindungen Epothilon B, Vioprolid A, Tubulysin A, Disorazol A und Purvalanol B behandelt.

5.4.1 Stimulation der Zellen mit verschiedenen Substanzen

Um die Bildung des TNF- α nachzuweisen wurden die Zellen in 10mL Zellkulturmedium auf einer Wachstumsfläche von 25 cm² bis zur Konfluenz kultiviert. Die Substanzen wurden, in den in Tabelle 2 angegebenen Konzentrationen, zugegeben und für 18 Stunden bei 37°C und 10 %iger CO₂-Begasung inkubiert. TNF- α wurde mit dem ELISA im Zellkulturüberstand laut Protokoll bestimmt.

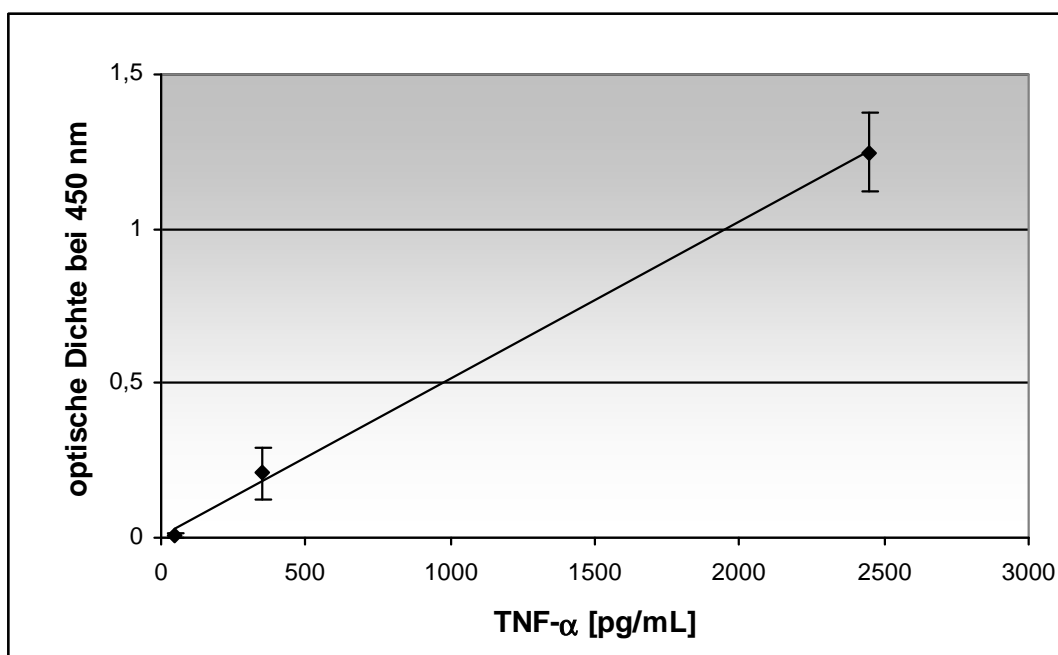


Abb. 40: Kalibriergerade des TNF- α ELISA Kits

Abbildung 40 zeigt die Kalibriergerade des ELISA, um die Linearität im Konzentrationsbereich von 0-2450 pg/mL TNF- α zu zeigen.

Neben den bekannten Stimulantien LPS und IFN- γ führte nur die Behandlung der Zellen mit Tubulysin A zu einem Anstieg der TNF- α Konzentration im Medium. Bei den ebenfalls

verwendeten Substanzen Epothilon B und Vioprolid A konnte keine TNF- α Bildung beobachtet werden (Tab. 8).

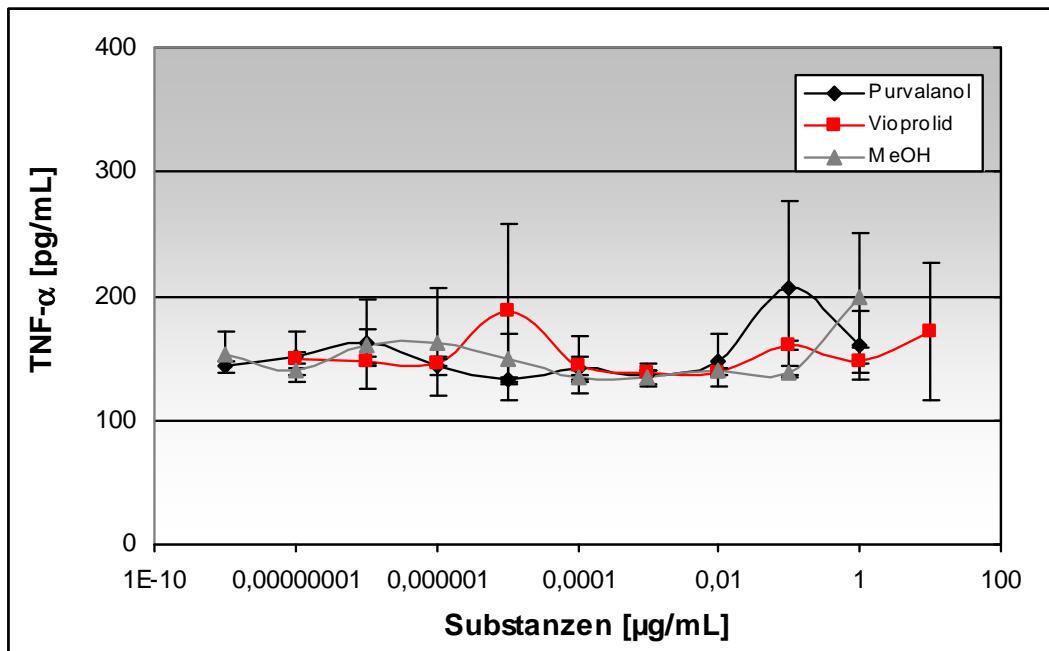
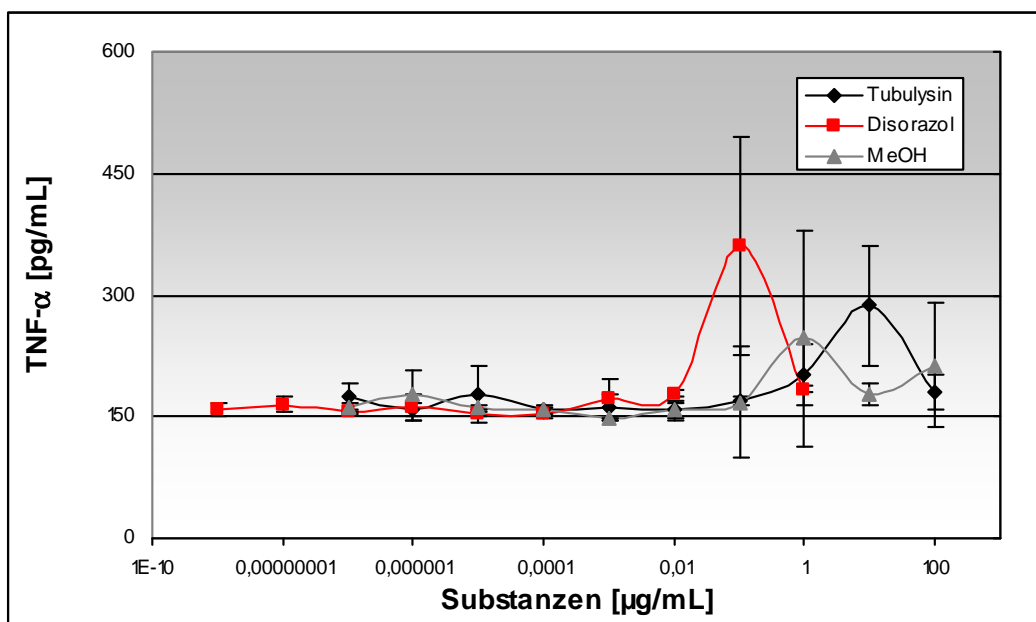
Tabelle 8: Konzentration des TNF- α nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen

Substanz	Endkonzentration der Substanz	Konzentration von TNF- α
LPS	100 ng/mL	> 2450 pg/mL
IFN- γ	100 ng/mL	~ 1400 pg/mL
Epothilon B	1 μ g/mL	0 pg/mL
Vioprolid A	1,5 μ g/mL	0 pg/mL
Tubulysin B	150 ng/mL	200–1000 pg/mL

5.4.2 Einfluss der Konzentration auf die TNF- α Bildung

Zur Bestimmung der Konzentrationsabhängigkeit der Substanzen in Bezug auf die TNF- α Produktion, wurden die Makrophagen in 96-well Mikrotiterplatten bis zur Konfluenz kultiviert und für 18 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Purvalanol B, Vioprolid A, Tubulysin A und Disorazol A behandelt. TNF- α wurde mit Hilfe des ELISAs in den Medienüberständen bestimmt.

Dabei zeigte sich wie in den vorangegangenen Experimenten, dass weder Purvalanol B noch Vioprolid A einen Effekt auf die Produktion von TNF- α hatten. Auch die höchsten Konzentrationen von 10 μ g/mL Vioprolid A und 1 μ g/mL Purvalanol B führten nicht zu einem Anstieg der Cytokinkonzentration (Abb. 41). Die TNF- α Konzentration schwankte um etwa 150 pg/mL und lag damit auf dem Niveau des Lösemittelhintergrundes. Die Konzentration des TNF- α nach Stimulation mit Tubulysin A und Disorazol A ist in Abbildung 42 dargestellt. Hier zeigte sich in den zweithöchsten Konzentrationen von Tubulysin A (10 μ g/mL) und Disorazol A (100 ng/mL) ein leichter Anstieg in der Konzentration des Cytokins, die jedoch aufgrund der großen Standardabweichung als nicht signifikant betrachtet werden. Die restlichen Konzentrationen lagen auch in diesem Fall im Bereich des Hintergrundes.

Abb. 41: TNF- α Konzentration nach Stimulation mit Purvalanol B und Vioprolid AAbb. 42: TNF- α Konzentration nach Stimulation mit Tubulysin A und Disorazol A

5.4.3 Zeitabhängigkeit der TNF- α Bildung

Zur Überprüfung einer möglichen Zeitabhängigkeit der Stimulation der Zellen wurden diese in 96-well Mikrotiterplatten bis zur Konfluenz kultiviert und mit den Substanzen LPS und Tubulysin A in folgenden Konzentrationen behandelt: 1 ng/mL, 10 ng/mL, 100 ng/mL und 1000 ng/mL

Die restlichen Substanzen wurden aufgrund der vorausgehenden Ergebnisse außer Acht gelassen. Die Probennahme aus den Medienüberständen erfolgte nach 0 Stunden, 1 Stunde, 3 Stunden sowie 24 Stunden und wurde auf den Gehalt von TNF- α untersucht (Kap. 4.8.1). In Abb. 43 und Abb. 44 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt. Die Behandlung der Zellen mit LPS führte schon nach drei Stunden zu einem Anstieg der TNF- α Produktion in einem Konzentrationsbereich zwischen 100 und 1000 ng/mL bis auf einen Höchstwert von etwa 4 ng/mL TNF- α . Nach 24 Stunden zeigte sich dieser Effekt noch deutlicher und führte auch in den geringeren Konzentrationen ab 1 ng/mL zu einem erkennbaren Anstieg der TNF- α Konzentration auf etwa 1,5-2 ng/mL. Die TNF- α Konzentration für die höchste LPS Konzentration von 1000 ng/mL lag bei nahezu bei 5ng/mL.

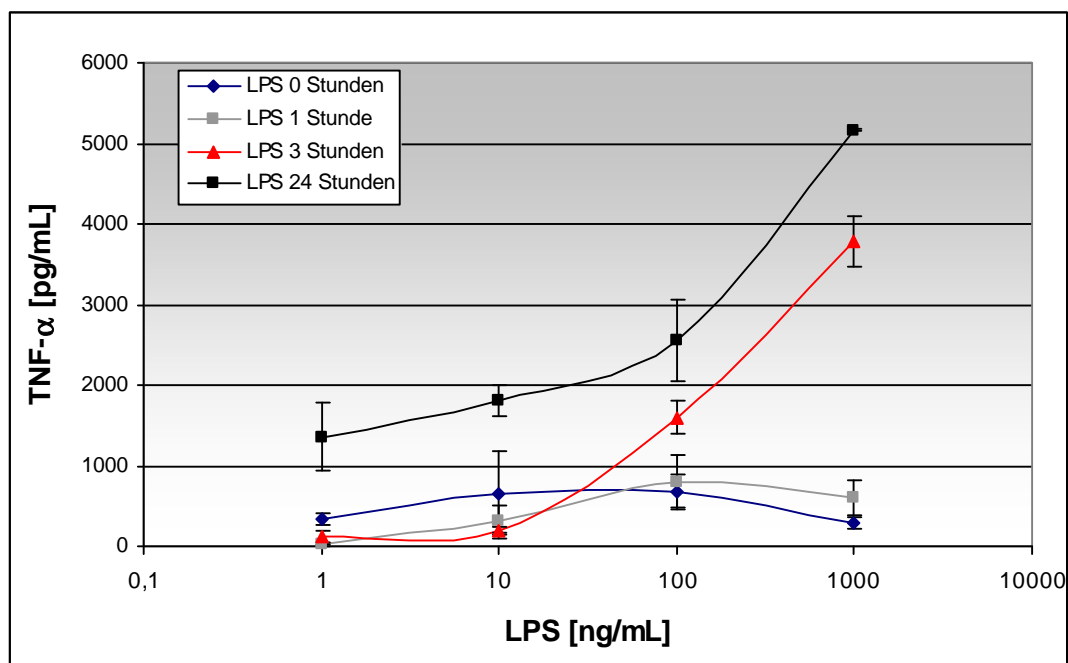


Abb. 43: TNF- α Konzentration nach Behandlung der Zellen mit LPS

Die Inkubation der Zellen mit Tubulysin A zeigte, dass die Zellen nach 24 Stunden eine gesteigerte Produktion von TNF- α aufwiesen. Dabei ließ sich der Hauptanstieg bei einer Tubulysin-Konzentration zwischen 1 und 10 ng/mL feststellen. Bei den höheren Konzentrationen fiel der TNF- α -Gehalt im Vergleich zu den niedrigeren wieder ab und lag im Bereich von 2,7 ng/mL TNF- α . Zu den früheren Zeitpunkten ließ sich lediglich eine leichte Steigerung in der Produktion des Tumor Nekrose Faktors im Vergleich der verschiedenen Konzentrationen ableiten. Die Werte schwankten zwischen 200 und 800 pg/mL TNF- α (Abb. 44) und deuteten nicht auf eine Konzentrationsabhängigkeit hin.

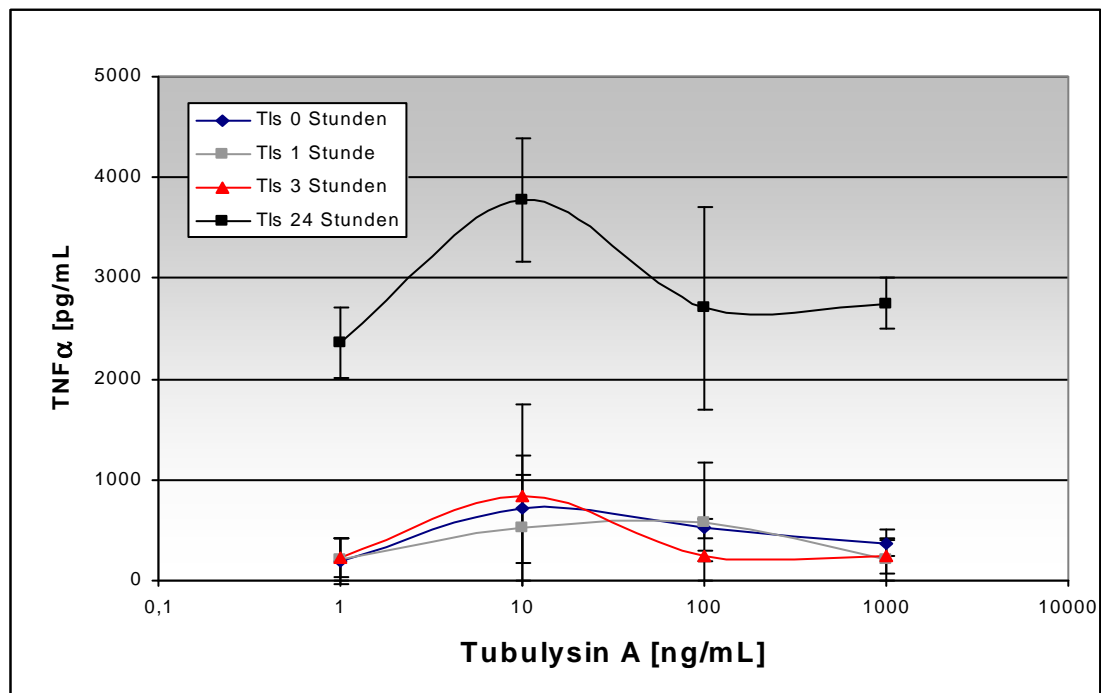


Abb. 44: TNF- α Konzentration nach Inkubation der Zellen mit Tubulysin A

5.5 Nachweis des Cytokins Interleukin 6 (IL 6)

5.5.1 Inkubation der Zellen mit verschiedenen Naturstoffen

Parallel zum Nachweis von Stickstoffmonoxid und TNF- α wurde mit Hilfe der ELISA-Technik die Sekretion des Interleukin 6 in das Zellkulturmedium nachgewiesen. Mit Hilfe der in Abbildung 45 dargestellten Kalibriergeraden konnte Interleukin 6 in einem Konzentrationsbereich von 0–10.000 pg/ml nachgewiesen werden (für selbstzusammengestellten ELISA). Die Kalibriergerade für den kommerziellen ELISA zeigte eine Linearität bis etwa 2500 pg/mL (nicht dargestellt). Um eine bessere Vergleichbarkeit der Werte zu erreichen wurden die höheren Konzentrationen als >2500 pg/mL angegeben.

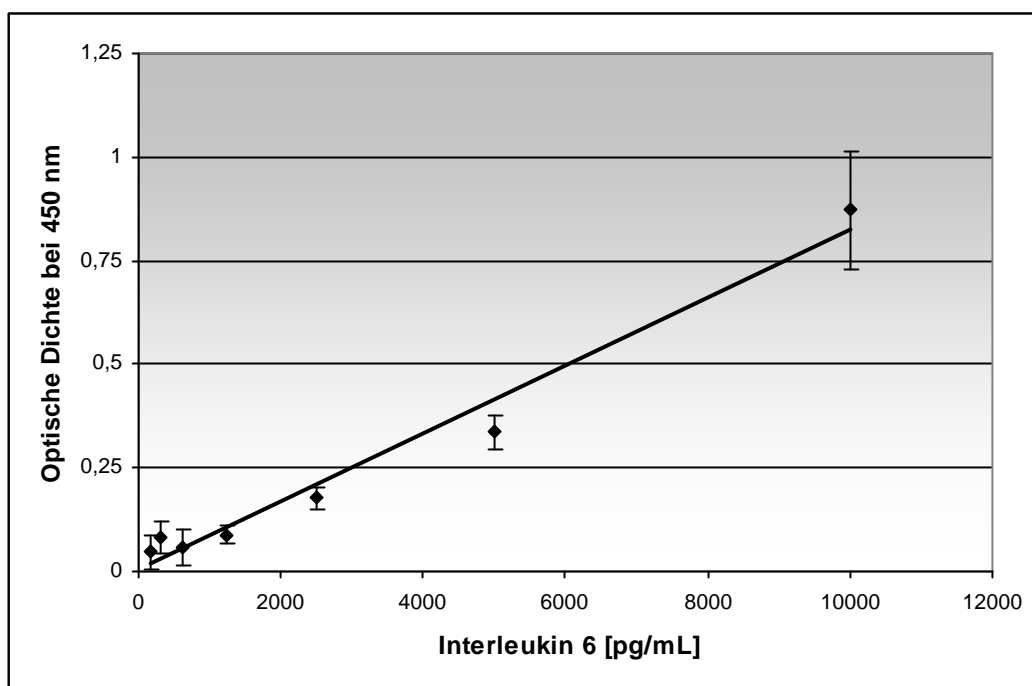


Abb. 45: Kalibriergerade IL-6 ELISA

Dabei wurden erneut LPS und Interferon γ als Standard-Stimulantien in der Endkonzentration von 100 ng/mL eingesetzt.

Tabelle 9: Konzentrationen des IL-6 nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen

Substanz	Endkonzentration der Substanz	Konzentration von IL 6
LPS	100 ng/mL	> 2500 pg/mL
Interferon γ	100 ng/mL	~ 160 pg/mL
Epothilon B	1 μ g/mL und 100 ng/mL	0 pg/mL
Vioprolid A	1,5 μ g/mL und 500 ng/mL	0 pg/mL
Tubulysin A	150 ng/mL und 100 ng/mL	160-300pg/mL
Disorazol A	10 pg/mL und 100 pg/mL	0 pg/mL

Neben den Standard-Stimulantien LPS und IFN- γ führte nur die Behandlung mit Tubulysin zu einem leichten Anstieg der Interleukin Produktion, der etwa im Bereich der erreichten Werte nach Stimulation mit IFN- γ lag. Die anderen Substanzen Epothilon B, Vioprolid A und Disorazol A führten zu keiner Veränderung in der Produktion des Interleukin 6 (Tab. 9).

5.5.2 Zeitabhängiger Anstieg der IL-6 Produktion nach Stimulation mit Tubulysin A

Die Zeitabhängigkeit wurde auch für die Bildung von Interleukin 6 nach Stimulation mit Tubulysin A bestimmt. Dazu wurden die Zellen in einer 96-well Mikrotiterplatte bis zur Konfluenz kultiviert und mit Tubulysin A in den Konzentrationen 1, 10, 100 und 1000 ng/mL behandelt. Zu den Zeitpunkten 0, 1, 3 und 24 Stunden wurde der Medienüberstand abgenommen und IL-6 bestimmt. Wie aus Abbildung 46 hervorgeht, ließ sich dabei nicht nur eine Zeit-, sondern auch eine Konzentrationsabhängigkeit feststellen. Inkubationszeiten von weniger als 24 Stunden führten zu keinem nennenswerten Anstieg der IL-6-Konzentration. Die für die höchsten Konzentrationen von 100 ng/ml und 1 μ g/mL Tubulysin A ermittelten IL-6 Konzentrationen lagen dabei im Bereich der vorangegangenen Messungen (Tab. 8).

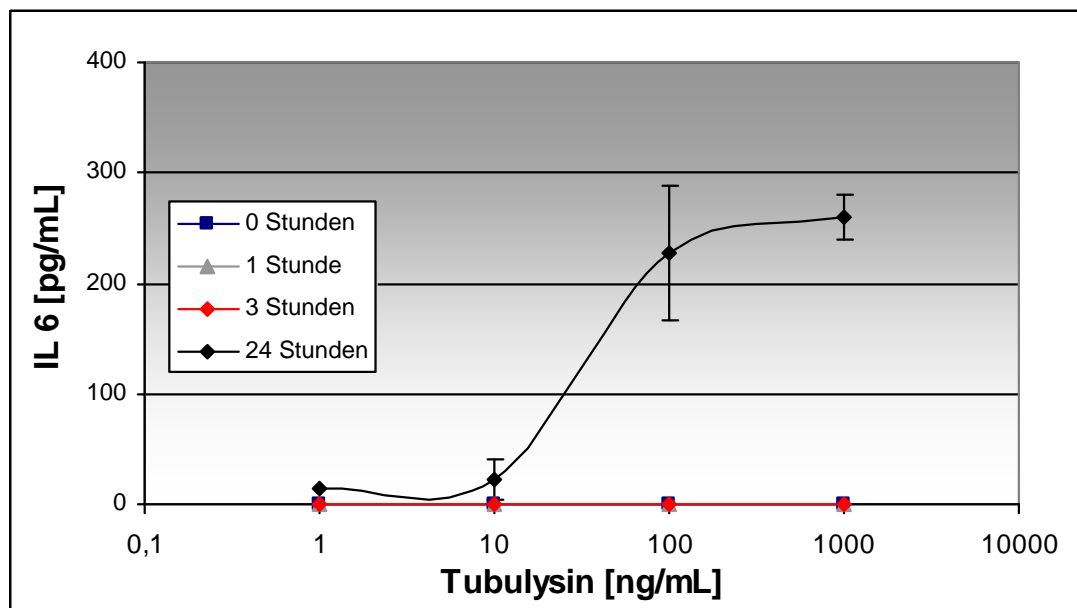


Abb. 46: Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der IL-6 Produktion nach Inkubation mit Tubulysin A

Die ebenfalls verwendeten Verbindungen Disorazol A, Epothilon B und Vioprolid A zeigten keinen Einfluss auf die Produktion von TNF- α Produktion (Ergebnisse nicht dargestellt).

5.6 Einfluss auf die Phagozytose

Die Phagozytose stellt eine der zentralen Funktionen der Makrophagen im Immunsystem der Wirbeltiere dar und ist für die Aufnahme und den Abbau von schädlichem bzw. abgestorbenem Material zuständig. Da an diesem Vorgang das Cytoskelett und somit möglicherweise auch die Mikrotubuli beteiligt sind, sollte in den folgenden Versuchen untersucht werden, inwieweit die verwendeten Substanzen einen Einfluss auf die Phagozytose der Makrophagen hatten. Dazu wurden die Zellen, wie unter 4.2 im Material und Methoden Teil beschrieben, kultiviert und mit den Substanzen inkubiert. Die Cytochalasinprobe (nicht dargestellt) diente in den Versuchen als Positivkontrolle einer Phagozytosehemmung.

5.6.1 Zeitlicher Verlauf der Phagozytose von *E.coli*-Zellen

Bevor die Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Phagozytose untersucht wurde, sollte der allgemeine Verlauf der Phagozytose von *E.coli*-Zellen getestet werden. Dazu wurde der oben beschriebene Phagozytostest ohne Behandlung der Zellen durchgeführt, und die Fluoreszenz zu verschiedenen Zeitpunkten im Zeitraum von 0-360 Minuten ermittelt (Abb. 47).

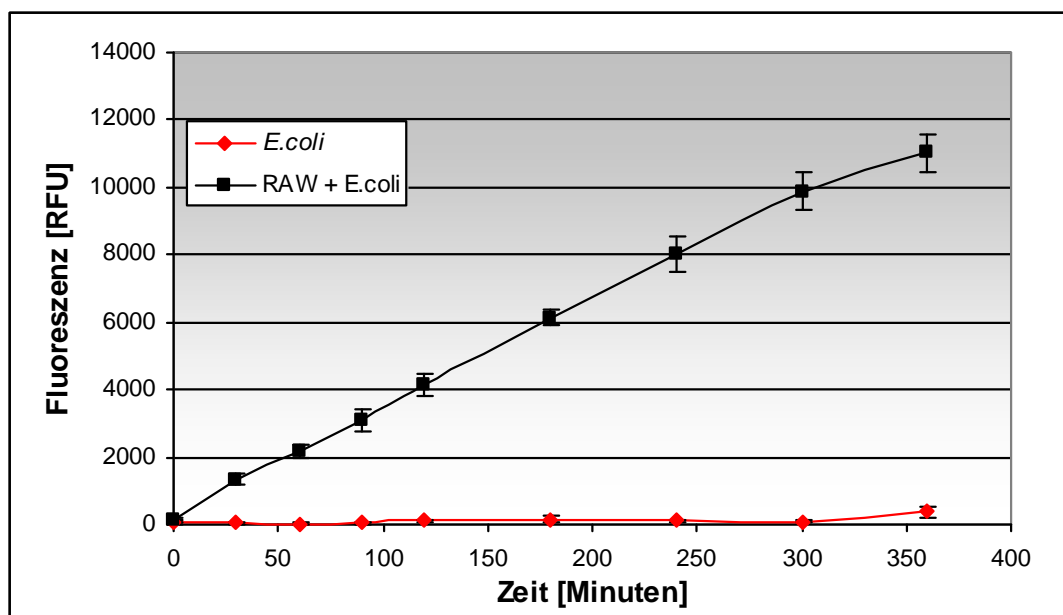


Abb. 47: Zeitlicher Ablauf der Phagozytose

Dabei stieg die Fluoreszenz der phagozytierenden Makrophagen kontinuierlich bis auf ca. 11000 relative Fluoreszenzeinheiten (RFU), während die *E.coli*-Zellen allein lediglich eine Fluoreszenz von etwa 360 RFU zeigten. Es wurde keine Sättigung der Phagozytosekapazität beobachtet. Nach 90 Minuten war die RFU ausreichend hoch, dieser Zeitpunkt wurde als Endpunkt der Messungen für die folgenden Versuche gewählt.

5.6.2 Einfluss der Substanzen auf die Phagozytose

Die Einflüsse der Substanzen auf die Phagozytoseaktivität der Makrophagen wurden in Abhängigkeit der Konzentrationen und der Inkubationszeiten getestet. Die gewählten Inkubationszeiten der Naturstoffe lagen bei 30 Minuten, 2 Stunden, 14 Stunden und 70 Stunden. Die in den folgenden Grafiken dargestellten Werte zeigen jeweils den nach 90 Minuten Phagozytose ermittelten Fluoreszenzwert bezogen auf die MeOH Kontrolle.

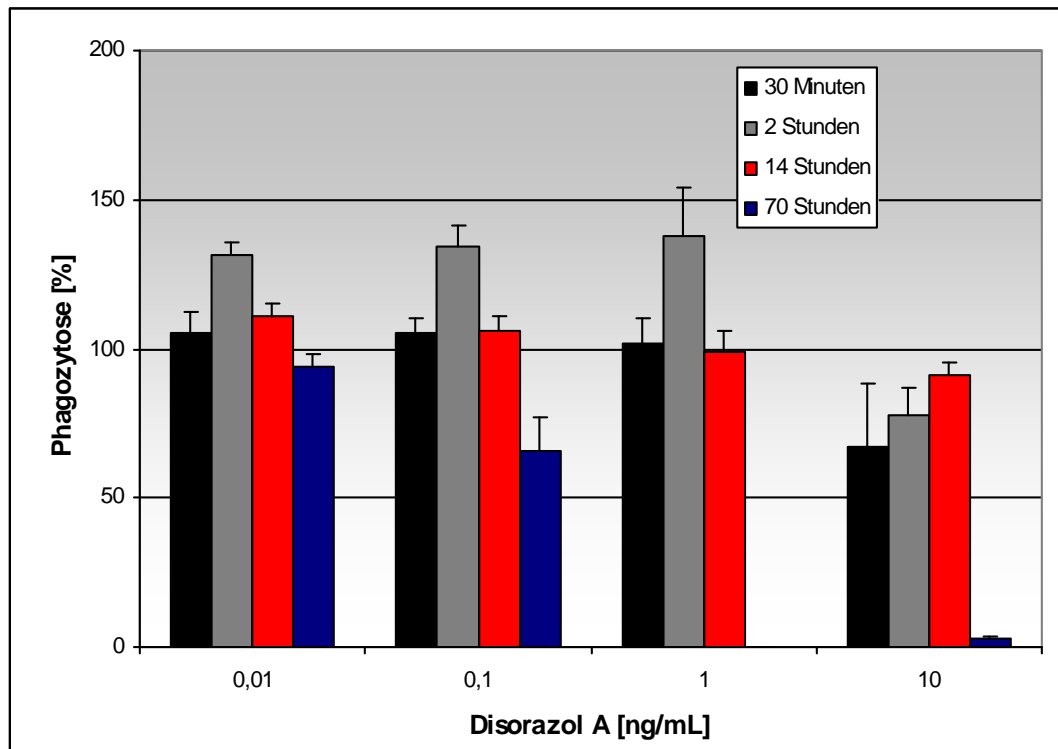


Abb. 48: Einfluss auf die Phagozytoseaktivität durch Disorazol A

Die Inkubation mit Disorazol A erfolgte in einem niedrigeren Konzentrationsbereich als bei den anderen Substanzen, um toxische Effekte weitgehend auszuschließen. Bei den beiden höchsten eingesetzten Konzentrationen des Disorazol (1 und 10 ng/mL) zeigte sich nach 70 Stunden ein deutlicher und bei 100 pg/mL ein leichter Einfluss auf die Phagozytose der Zellen (Abb. 48). Die restlichen Konzentrationen und Inkubationszeiten hatten keinen so deutlichen Effekt. Lediglich eine Konzentration von 10 ng/mL erzeugte bei den verschiedenen Inkubationszeiten, im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten mit niedrigeren Konzentrationen, einen leicht hemmenden Effekt.

Die Stimulationen der Zellen mit den Substanzen Epothilon B, Tubulysin A, Vioprolid A und Purvalanol B fanden jeweils in den gleichen Konzentrationsbereichen statt. Die gewählten

Konzentrationen lagen bei 0,8, 4, 20, 100 ng/mL und befanden sich damit unterhalb des toxischen Bereiches.

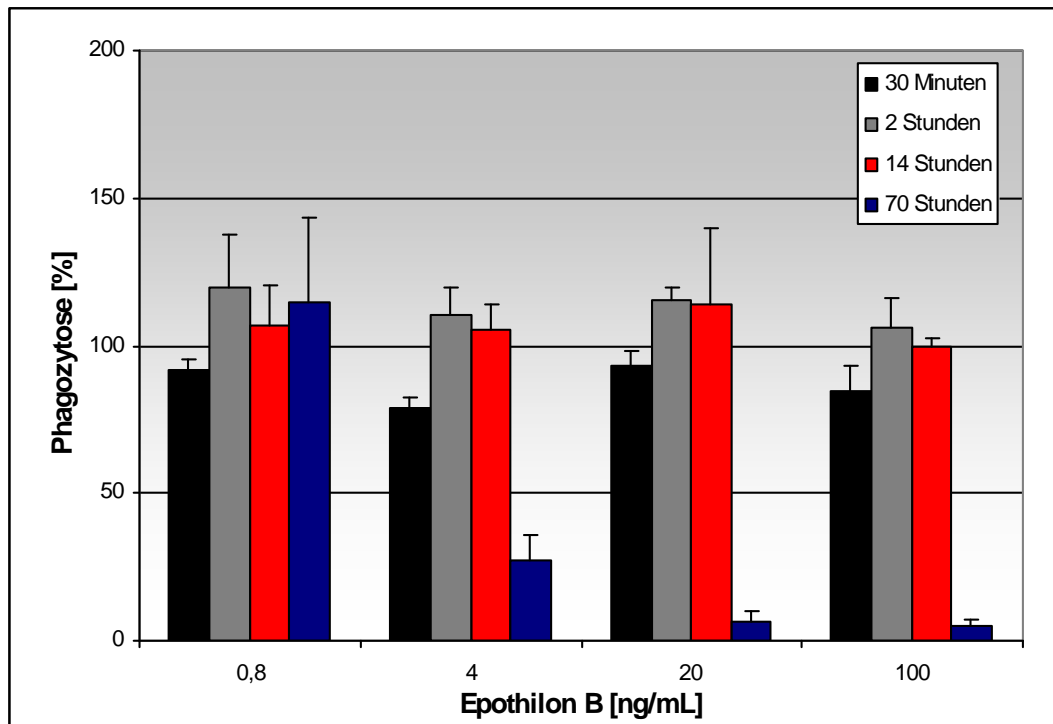


Abb. 49: Einfluss auf die Phagozytoseaktivität durch Epothilon B

Ein Einfluss von Epothilon B auf die Phagozytoseaktivität der Zellen ließ sich nach 30 Minuten, 2 und 14 Stunden nur leicht feststellen. Dabei war die niedrigste gewählte Konzentration (0,8 ng/mL) am wenigsten effektiv. Die anderen Konzentrationen (4, 20 und 100 ng/mL) zeigten nach einer Einwirkzeit von 30 Minuten eine leichte Beeinflussung der Phagozytoseaktivität (besonders bei 4 ng/mL), jedoch nicht bei den längeren Inkubationszeiten von 2 bzw. 14 Stunden. Der deutlichste hemmende Effekt trat nach 70 Stunden auf und zeigte eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit (Abb. 49). Während der 70 Stunden Wert bei einer Konzentration von 0,8 ng/mL noch eine 100 %ige Phagozytose darstellte, sank die Aktivität schon bei Konzentration von 4 ng/mL auf nur noch etwa 25 %, um bei den beiden höchsten eingesetzten Konzentrationen (20 und 100 ng/mL) auf Hintergrundniveau reduziert zu sein.

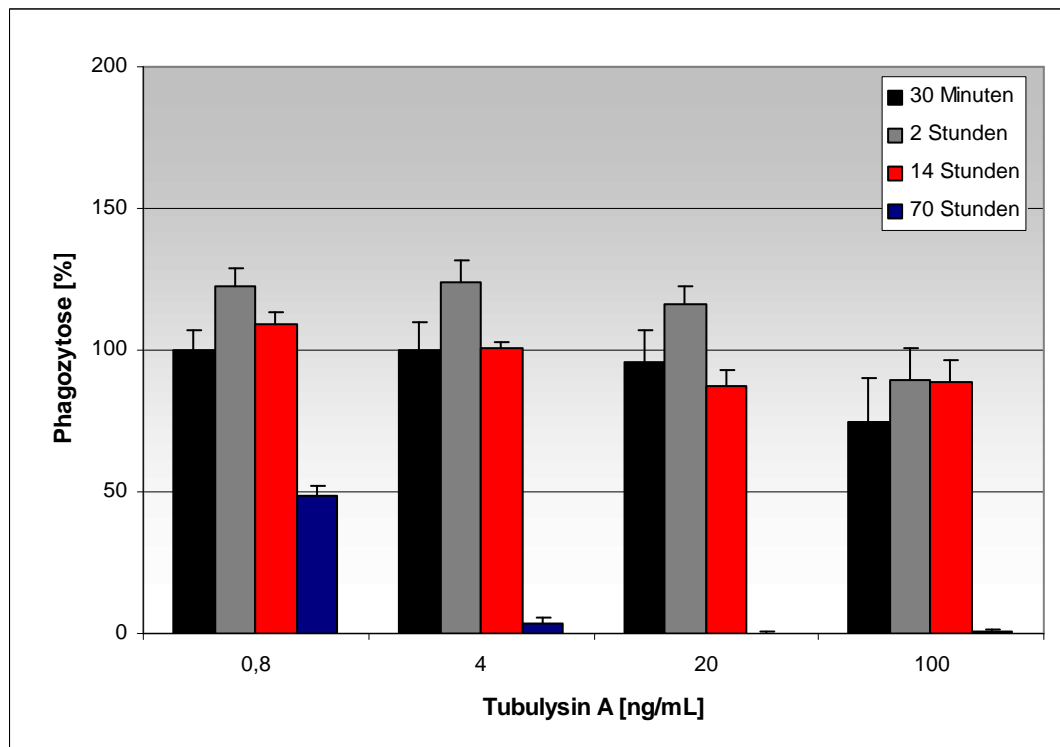


Abb. 50: Einfluss auf die Phagozytoseaktivität durch Tubulysin A

Dies korrelierte mit den Ergebnissen der vorangegangenen Vitalitätstests (Kap. 4.2). Bei einer Inkubation der Zellen mit Tubulysin zeigte sich ein ähnliches Bild. Eine leicht hemmende Wirkung des Tubulysin A auf die Phagozytoseaktivität der Makrophagen ließ sich zu den kürzeren Inkubationszeiten (30 Minuten, 2 und 14 Stunden) nur bei der höchsten gewählten Konzentration von 100 ng/mL feststellen. Nach einer Inkubationszeit von 70 Stunden wurde ein hemmender Effekt der Substanz in allen Konzentrationen deutlich. Bereits die niedrigste Konzentration von 0,8 ng/mL führte zu einer Reduktion der Phagozytose um 50 %. Die höheren Konzentrationen führten nach Inkubation über 70 Stunden zu einer totalen Hemmung (Abb. 50).

Für Vioprolid A und Purvalanol B zeigte sich keiner dieser oben erwähnten Effekte. Die Phagozytoseaktivität wurde durch die Zugabe dieser Substanzen in keiner Weise beeinflusst, auch nicht in den höchsten gewählten Konzentrationen und längsten Inkubationszeiten (keine graphische Darstellung). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Substanzen im Zeitraum von 30 Minuten bis 14 Stunden nur geringe Effekte auf die Phagozytoseaktivität zeigten und die nach 70 Stunden beobachteten Einflüsse den bereits toxischen Effekten der Substanzen ähnlich waren. Tubulysin A erzeugte dabei im Gegensatz zu Disorazol A und Epothilon B bereits in der geringsten Konzentration einen deutlichen Effekt.

5.6.3 Mikroskopische Betrachtung der Phagozytose

Die Betrachtung der Phagozytose mittels Fluoreszenzmessung (Kap. 5.6.2) ergab, dass die Aufnahme der *E.coli*-Zellen nach 6 Stunden noch nicht abgeschlossen war. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurden parallel zur Fluoreszenzmessung mikroskopische Aufnahmen der Zellen während der Phagozytose gemacht. Die in Abbildung 51 und 52 dargestellten Zellen wurden nicht mit einer Substanz, sondern lediglich mit den mit CFSE gefärbten *E.coli*-Zellen inkubiert, bei 40facher Vergrößerung mikroskopiert und fotografiert. Dabei wurde das Durchlicht durch einen Blaufilter geleitet und somit eine für das CFSE benötigte Anregungswellenlänge des Lichtes von etwa 490 nm erzeugt. Die Emissionswellenlänge lag bei etwa 520 nm und wurde als grünliche Färbung der Bakterien sichtbar. Aus den Abbildungen wird ersichtlich, dass nach 60 Minuten deutlich mehr fluoreszierende *E.coli*-Zellen an und in die Makrophagen verlagert worden waren als nach 30 Minuten. Diese Beobachtung deckte sich mit den Messungen der relativen Fluoreszenz (Kap. 5.6.2). In Abbildung 52 ist außerdem anhand der kreisförmigen Anlagerung der fluoreszenzgefärbten *E.colis* zu erkennen, dass die aufgenommenen Bakterien an der Zellmembran der Makrophagen zu finden waren. Eine Aussage darüber, ob sich Bakterien innerhalb oder außerhalb der Makrophagen befanden, lässt sich so allerdings nicht treffen.

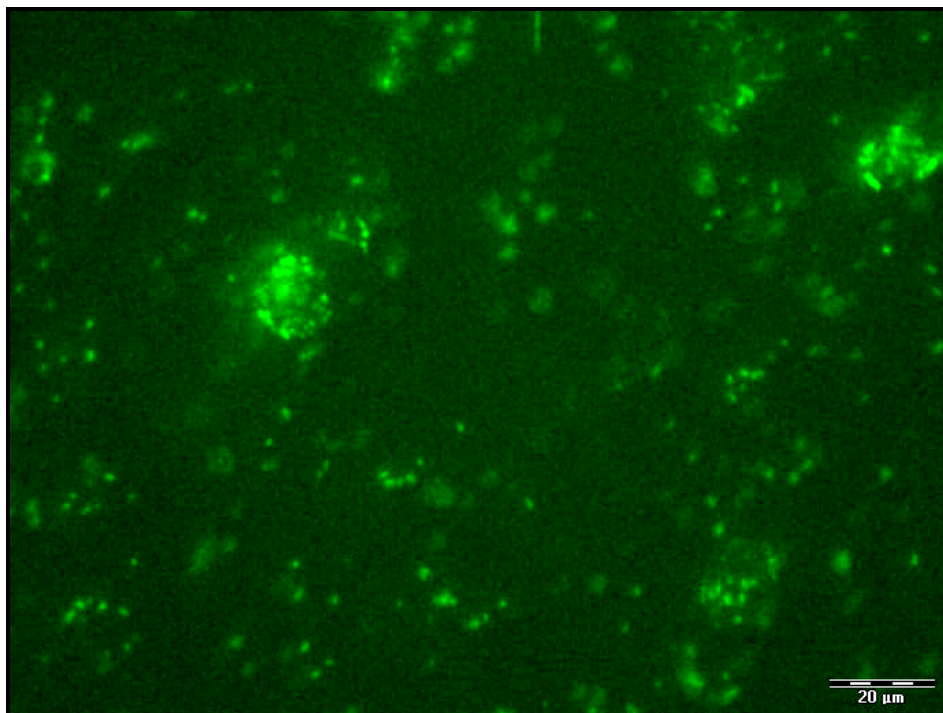


Abb. 51: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Phagozytose nach 30 Minuten ohne Stimulation

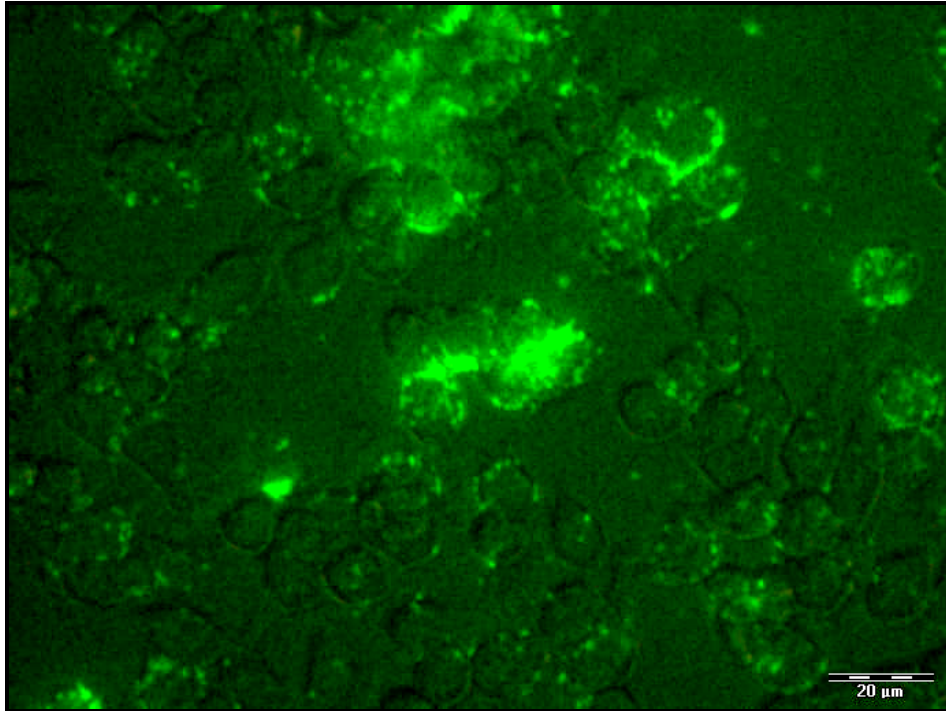


Abb. 52: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Phagozytose nach 60 Minuten ohne Stimulation

5.7 Zweidimensionale Gelelektrophorese

Mit der zweidimensionalen Gelelektrophorese sollte die Beeinflussung der Zellen durch die Behandlung mit den Substanzen auf Proteinebene untersucht werden. Dazu wurden die Makrophagen mit den oben genannten Substanzen behandelt, die Zellen aufgeschlossen und die gewonnenen Proteine zur Analyse verwendet. In Abbildung 53, 54 und 55 sind stellvertretend die zweidimensionalen Gele der MeOH-Kontrolle, des Interferon- γ - und des Purvalanol B-Experiments dargestellt.

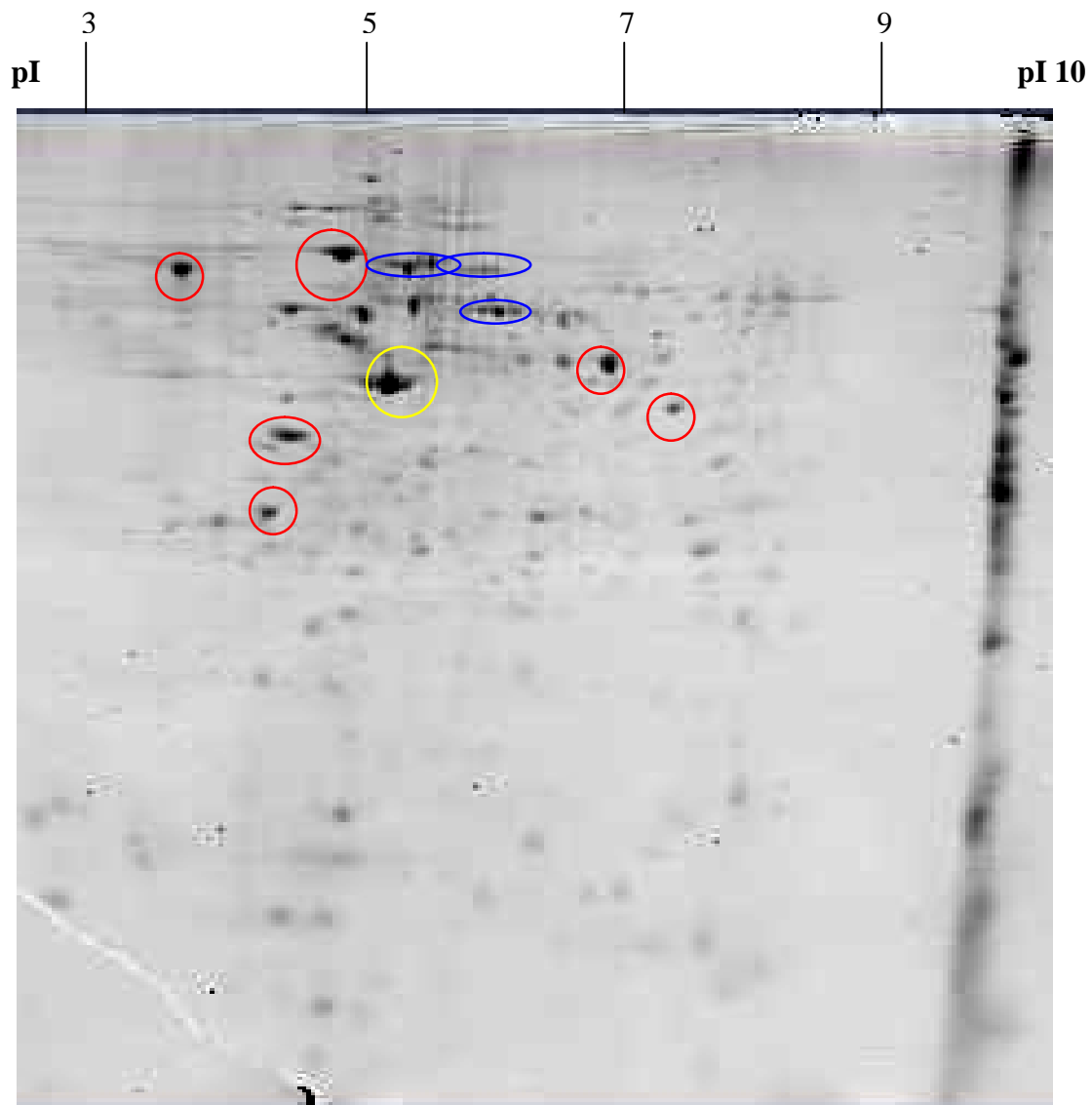


Abb. 53: Zweidimensionales Gel der MeOH behandelten Zellen

Aus Abbildung 53, 54 und 55 lässt sich erkennen, dass der Hauptanteil der gewonnenen Proteine in einem Bereich von pH4-8 und im oberen Bereich des Gels, das heißt im hochmolekularen Bereich, zu finden waren. Die niedrigeren und höheren pH-Wert Bereiche der IPG-Streifen erhielten nur wenige oder niedrig konzentrierte Proteine, welche nur als

schwache Spots sichtbar wurden. Die Streifen der Gele am pI10 ergaben sich aus allen Proteinen, welchen einen pI von 10 oder darüber hatten und sich an dieser Stelle im IPG-Streifen sammelten. Mit Hilfe der PDQuest Software der Firma BioRad wurden die Gele nach dem Scannen weiter bearbeitet. Nach subjektiver Bestimmung der kleinen und großen Spots sowie des Hintergrunds, bestimmte die Software dabei zunächst die Gesamtanzahl der gefundenen und angefärbten Proteinspots. Dabei stellte sich heraus, dass jeweils etwa 2000 Spots in den Gelen zu finden waren. Es zeigten sich auch jeweils an denselben Stellen wiederkehrende Spotmuster.

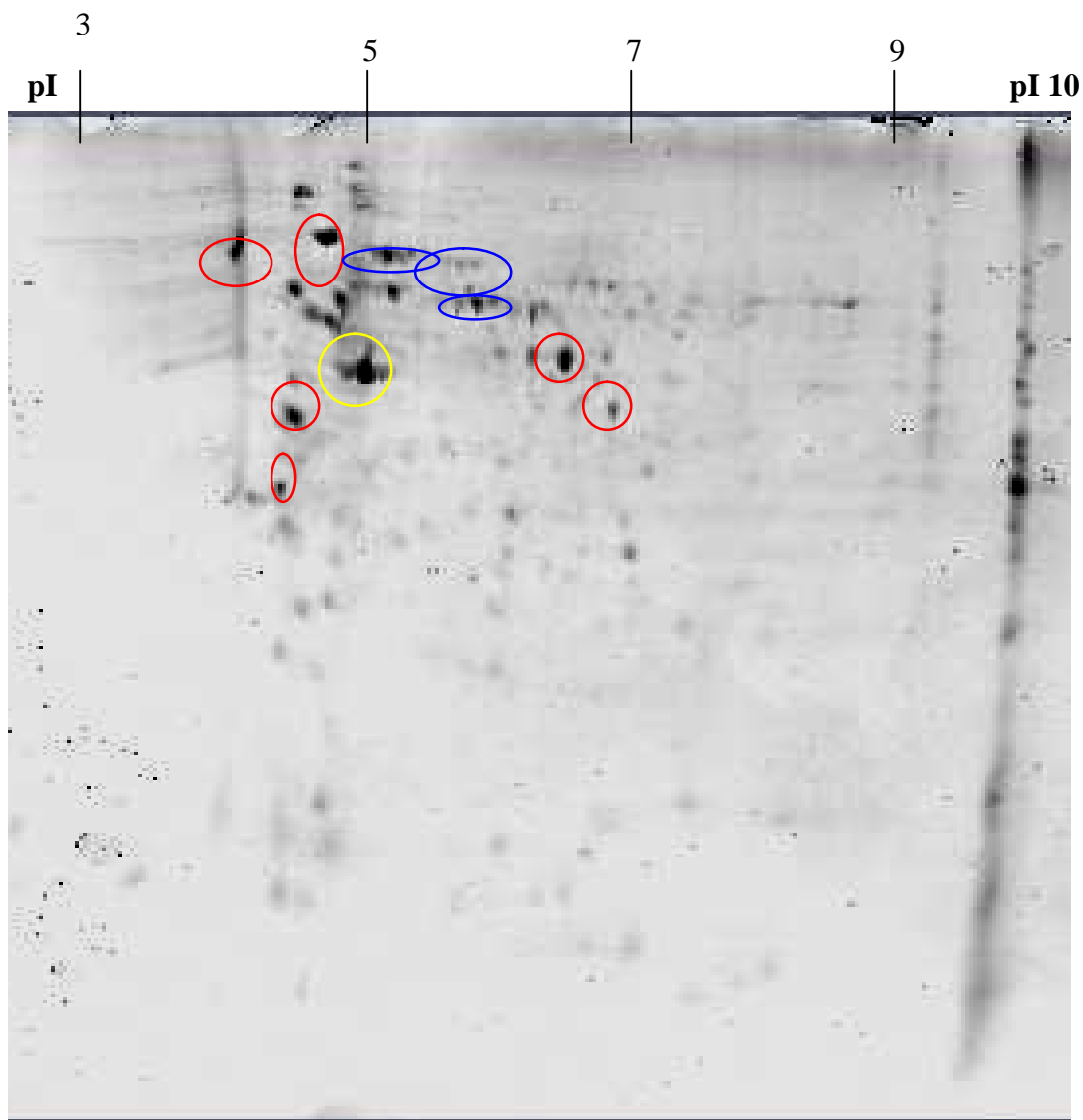


Abb. 54: Zweidimensionales Gel der Interferon γ behandelten Zellen

Diese wiederkehrenden Spots (einige Beispiele sind rot umrandet) unterschieden sich in den behandelten bzw. unbehandelten Proben lediglich zum Teil durch die Intensität und Größe der Spots. Bei den wie aneinander gereiht aussehenden Proteinen (einige Beispiele sind blau umrandet) handelt es sich in der Regel um phosphorylierte oder auf andere Art modifizierte

Proteine, welche sich durch die Ladung jedoch nicht die Masse, der Proteine unterscheiden. Schon aus diesen Abbildungen lässt sich erkennen, dass sich die Proteinmuster der verschiedenen Proben in vielen Bereichen stark gleichen, allerdings auch Unterschiede auftreten, welche sich meist in der Spotintensität, also in der Proteinmenge bemerkbar machen. Bei dem gelbumrandeten Proteinspot handelt es sich vermutlich um ein Proteingemisch in dem möglicherweise Actin als gängiges housekeeping Protein enthalten ist.

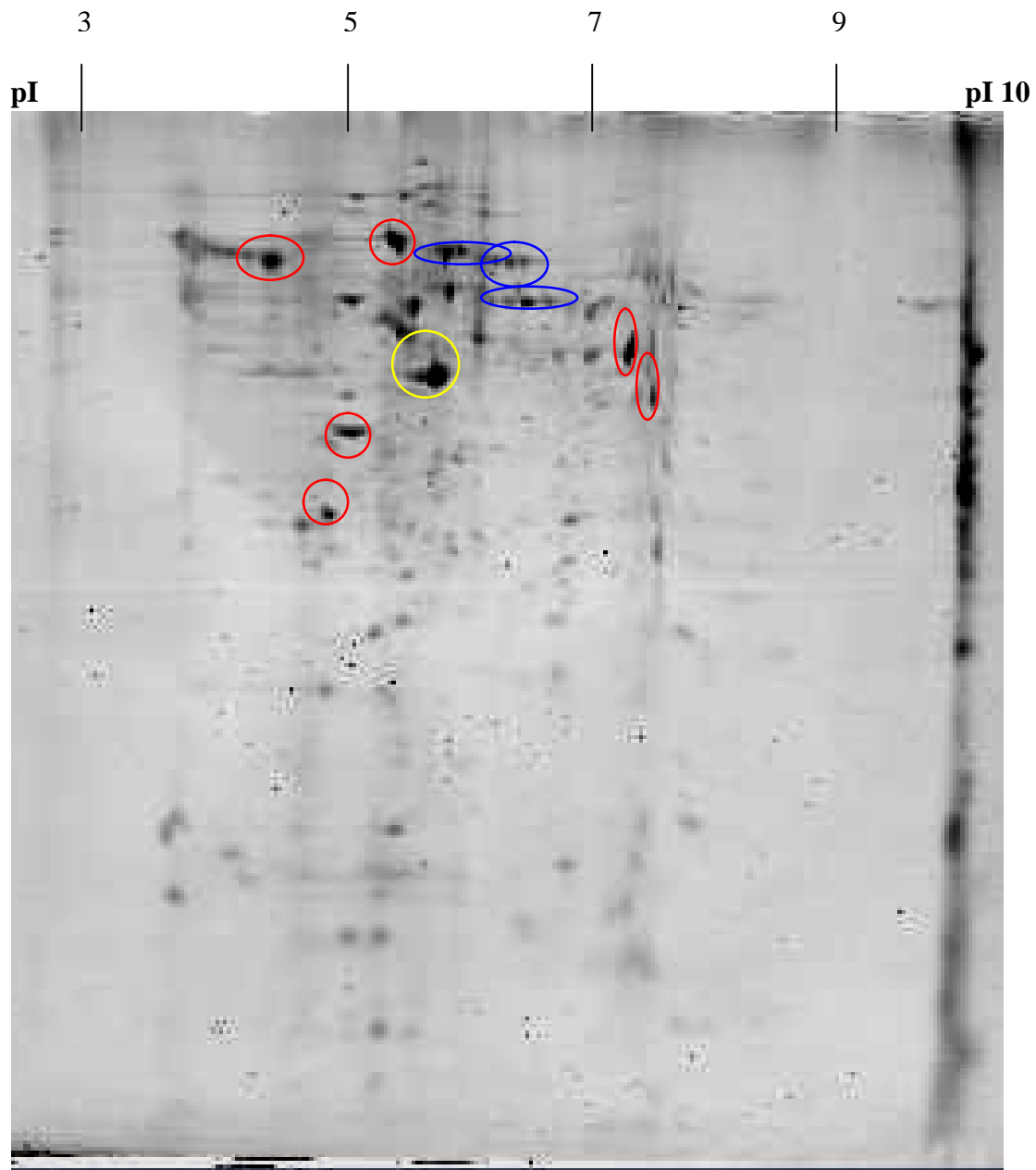


Abb. 55: Zweidimensionales Gel der Purvalanol B behandelten Zellen

Der pI-Wert von Actin, welcher - je nach dem aus welchem Gewebe die Zellen stammen- bei etwa 5,1 bis 5,2 liegt, und die molekulare Masse von etwa 45kDa [57] deuteten darauf genauso hin wie die starke Intensität des Spots, was auf eine große Menge Protein schließen

lässt. Generell lässt sich sagen, dass die Analyse der zweidimensionalen Gele sich sehr schwierig gestaltete, da die deutlich erkennbaren Spots in allen Ansätzen vertreten waren und nur sehr geringe Unterschiede zwischen den Gelen zu finden waren. Die Nicht-Reproduzierbarkeit der Gele stellte eine weitere Schwierigkeit dar. Aufgrund der aufgetretenen Probleme wurde auf eine weitere Analyse der Gele mittels Massenspektrometrie verzichtet.

6. Diskussion

In dieser Doktorarbeit wurden die Auswirkungen auf die Funktionen von Mausemakrophagen (Zelllinie RAW 264.7) nach der Behandlung mit verschiedenen Substanzen getestet. Dabei wurden sowohl bereits bekannte Verbindungen, wie das bakterielle Lipopolysaccharid (LPS), der körpereigene Mediator Interferon γ (IFN- γ) und der kommerzielle Kinaseinhibitor Purvalanol B, als auch nicht kommerzielle Substanzen wie die Sekundärmetabolite Disorazol A, Tubulysin A, Vioprolid A und Epothilon B verwendet. Die Wirkung der Substanzen wurde dabei durch den Nachweis von Stickstoffmonoxid, der Cytokine IL-6 und TNF- α , sowie der Beobachtung der Phagozytoseaktivität der Zellen und einer Analyse der intrazellulären Proteine, untersucht. Die Wirkung der beiden bereits bekannten Substanzen LPS und IFN- γ wurde in der Literatur als immunstimulatorisch beschrieben und aus diesem Grund als Standard-Stimulantien verwendet. Die Sekundärmetabolite von Myxobakterien, stellen eine Quelle an Wirkstoffen dar, welche in den letzten Jahren wieder zunehmend an Bedeutung gewonnen hat. Als aktuelles Beispiel soll dazu das zur Zeit von der Firma Bristol-Myers Squibb in den amerikanischen Markt eingeführte Krebs-therapeutikum IXEMPRA genannt werden. Dieses basiert auf dem 1987 an der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF) entdeckten Naturstoff Epothilon, welcher aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* isoliert wurde. Im Gegensatz zu den Streptomyceten [2] und verschiedenen Pflanzen, welche eine große Quelle an Substanzen darstellen, welche das Immunsystems beeinflussen [58], sind für Myxobakterien bislang noch keine immunstimulatorischen oder immunsuppressiven Wirkungen von Substanzen beschrieben.

Als Beispiel für die Pflanzenwirkstoffe soll hier das Catalposid genannt werden, welches aus dem Trompetenbaum *Catalpa ovata* gewonnen wird. Diese Substanz hemmt die Produktion TNF- α und IL-6 nach Stimulation von RAW 264.7-Zellen ohne die Zellvitalität zu beeinflussen. Die Substanz verhindert die Bindung des LPS an die Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Makrophagen und wird aus diesem Grund z.B. in Korea als anti-inflammatorisches Mittel eingesetzt. Einige der gängigen Antibiotika führen bei der Zerstörung der infizierenden Bakterien zu einer vermehrten Ausschleusung des Endotoxins LPS, was zu einem septischen Schock führen kann. Substanzen wie das Catalposid könnten dabei als Therapie eingesetzt werden, um diese für den Körper schädliche Reaktion zu verhindern [58]. Die Behandlung der Zellen mit LPS bzw. IFN- γ führt jedoch nicht nur zu einer funktionellen Aktivierung, sondern, in Konzentrationen >100 ng/mL bzw. von 50 ng/mL, auch zu morphologischen Veränderungen der Zellen, wie Vakuolenbildung und

Vergrößerung der Zellen, welche in der Literatur beschrieben sind [60], und auch in den mikroskopischen Aufnahmen beobachtet wurden (Daten nicht gezeigt).

Die Bildung der Cytokine, welche nach einer Stimulation mit LPS bzw. IFN- γ auftritt, wird genau wie die Produktion des Mediators NO über den NF- κ B-Signalweg vermittelt. Dieser Signalweg kann durch von außen eingebrachte Inhibitoren blockiert werden, was ebenfalls als antiinflammatorischer Therapieansatz verwendet werden kann. Kurzkettige Fettsäuren, die als Nebenprodukt aus der Verdauung von Fasern entstehen, sind in der Lage die Stimulation durch IFN- γ zu hemmen [59]. Sie wirken dabei auf die Phosphorylierung des ERK-Signalwegs, der an einer Produktion der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase beteiligt ist. Die p38 MAPK und JNK Phosphorylierung sind dabei nicht von einer Hemmung betroffen [59]. Die bekanntesten Wirkstoffe der Streptomyceten stellen die von ihnen produzierten Antibiotika wie das Streptomycin oder Tetracyclin dar, welche gängige Antibiotika gegen gram-negative und gram-positive Bakterien, aber auch gegen virale Infektionen und sogar gegen eukaryotische Parasiten sind [2].

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob und wie die verwendeten Substanzen einen Einfluss auf die Reaktionen und Funktionen der Makrophagen hatten. Dazu wurde die Sekretion der Cytokine Interleukin 6 und des Tumor Nekrose Faktor α sowie des Mediators NO untersucht. Zusätzlich zu diesen Untersuchungen wurde die Veränderung auf Proteinebene und der Einfluss auf die Phagozytosefähigkeit der Makrophagen getestet.

6.1 Kultivierung und mikroskopische Betrachtung der Zelllinie RAW 264.7

Die Kultivierungsbedingungen der Zelllinie wurden entsprechend der Angaben der American Type Culture Collection (ATCC) und aus Literaturangaben [47][49] gewählt. Die angegebenen Bedingungen sollten sowohl ein optimales Wachstum der Zellen als auch eine möglichst effektive Bildung der Mediatoren und Cytokine gewährleisten. Dazu wurden die Zellen in DME-Medium mit 10% hitzeinaktiviertem FBS und bei 10 %iger CO₂-Begasung bis zur Konfluenz kultiviert. Die bereits bekannten Bedingungen zur Stimulation mit LPS lagen dabei bei 37°C Inkubationstemperatur und bei einer Inkubationszeit von 18 Stunden [48]. Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass eine Detektion der IL-6 und TNF- α Produktion und ein NO-Nachweis nach Stimulation mit LPS bzw. IFN- γ zu früheren Zeitpunkten bis zu 18 Stunden mit Hilfe der verwendeten Methoden aufgrund von Detektionslimits nicht möglich war.

Die Veränderung der Temperatur hat einen Einfluss auf die Aktivierung und somit auf die Translokalisierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und damit auch auf die Aktivierung inflammationsspezifischer Gene, z.B. die Gene für die Cytokine IL-6, TNF- α und für die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) [47].

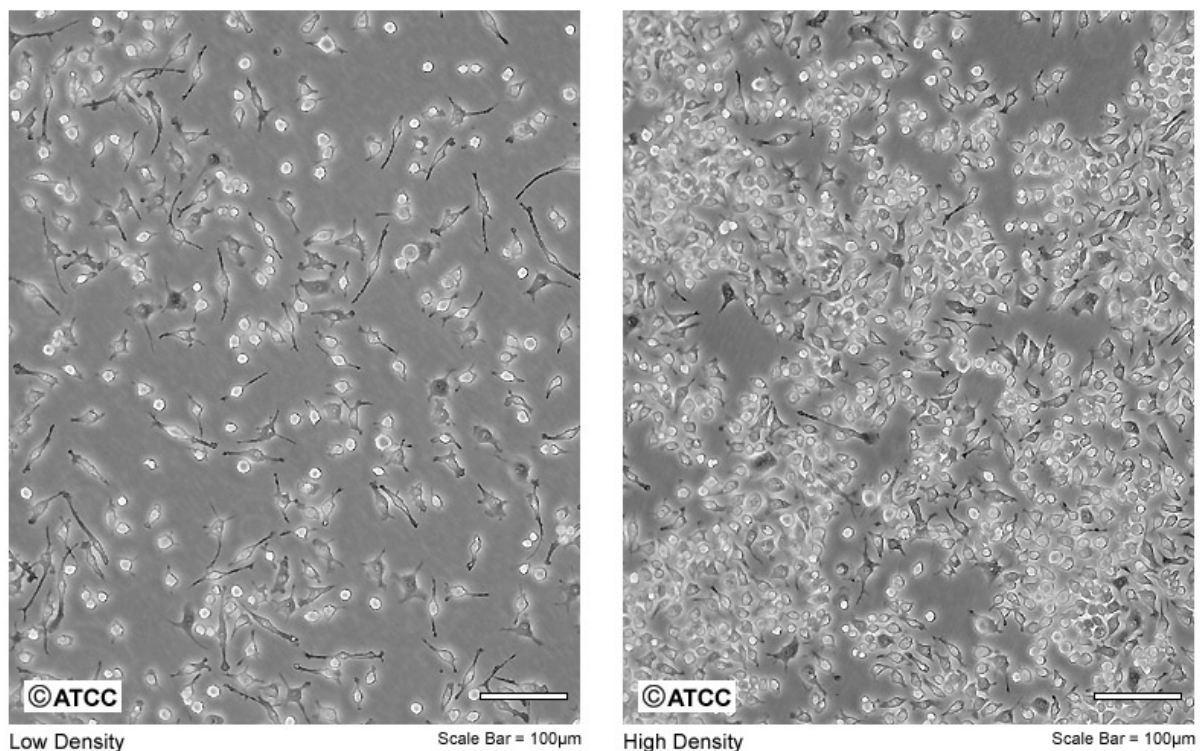


Abb. 56: Zellen der Zelllinie RAW 264.7 [50]

Bereits eine Erhöhung der Temperatur auf 40°C bzw. eine Erniedrigung auf 34°C führt zu einer vollständigen Suppression der Bildung von IL-6 innerhalb der ersten 12 Stunden nach

Zugabe von LPS [47]. Bei der Bildung von TNF- α erfolgt dieser Effekt erst nach 48 Stunden und damit außerhalb des in dieser Arbeit gewählten Zeitraums.

Da eine Veränderung des CO₂-Gehaltes zu einer Veränderung der pH-Wert Bedingungen im Zellkulturmedium führt und damit einen Einfluss auf das Wachstum der Zellen hätte, musste auch dieser genauestens beobachtet werden. Zu diesem Zweck wurde eine konstante 10 %ige CO₂ Atmosphäre in der Inkubationskammer hergestellt. Zusätzlich zu dieser Kohlendioxid-begasung herrschte eine 95 %ige Luftfeuchtigkeit, um Bedingungen zu schaffen, die den natürlichen Lebensraum der Zellen möglichst genau nachahmten.

In Abbildung 56 sind die Zellen in einer mikroskopischen Aufnahme der American Type Culture Collection (ATCC) zu sehen. Dabei wird die morphologische Veränderung der Zellen durch die Veränderung der Zelldichte deutlich, welche auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten zu beobachten war (vergleiche Abb. 26 und 27). Während die Zellen in einer niedrigen Zelldichte eher langgestreckt und mit pseudopodienartigen Ausläufern erscheinen, wirken sie in der höheren Zelldichte durch den Kontakt zu anderen Zellen eher kompakt. Bei einer längeren Betrachtung über mehrere Tage zeigte sich, dass die Zellkultur nach etwa 4 Tagen Kultivierung die Konfluenz erreicht hatte. Danach gingen die Zellen in eine stabile Phase über, welcher eine Phase folgte, in der die Zellzahl wieder abnahm (vergleiche Abb. 27). Der übliche Verlauf einer Wachstumskurve ist in Abbildung 57 dargestellt.

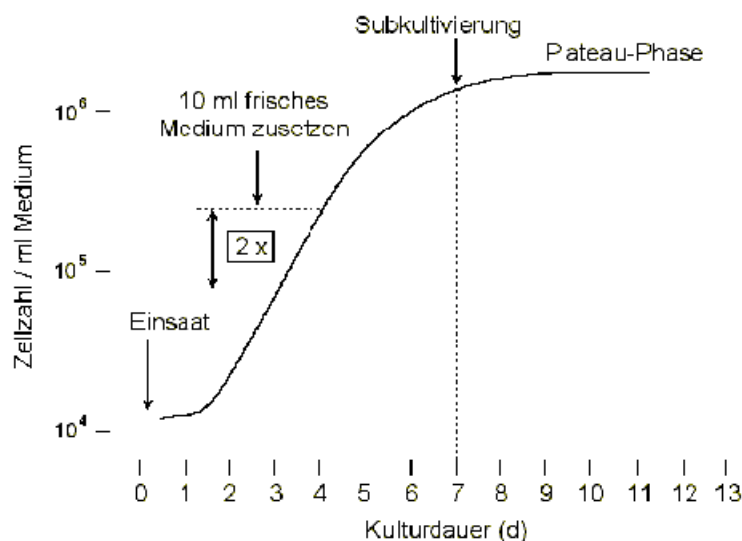


Abb. 57: Typische Wachstumskurve einer Zelllinie [70]

Der Verlauf ähnelt der Wachstumskurve von Bakterien, allerdings zeigen sich Unterschiede in der Teilungsrate und beim starken Absterben nach Erreichen der stationären bzw. Plateau-Phase. Der in Abbildung 57 vorgesehene Medienwechsel wurde in den vorliegenden Experimenten durch eine Subkultivierung bzw. die Ernte der Zellen ersetzt. Bei der hier dokumentierten Wachstumskurve (Kap. 5.1) war dies nicht der Fall, was den Eintritt in die Plateau-Phase nach vier Tagen Kultivierung erklärt, da die Zellen die Nährstoffe des Mediums verbraucht hatten, und durch Kontaktinhibition an einem weiteren Wachstum gehindert wurden. Auch die maximal erreichbare Zellzahl war dabei über die verschiedenen Versuche hinweg konstant und betrug etwa 2×10^6 Zellen/mL. Der Proteingehalt der aufgeschlossenen Zellen zu diesem Zeitpunkt pendelte sich bei etwa 2mg/mL ein und war damit ausreichend hoch für die folgenden Proteinanalysen vor. Dabei variierte die Proteinmenge pro Zelle sehr stark, obwohl diese konstant bleiben sollte. Dies lässt sich allerdings auf die ebenfalls stark schwankende Gesamtproteinmenge zurückführen und legt eine Ungenauigkeit beim Aufschluss der Zellen nahe.

6.2 Untersuchungen zur Toxizität der verwendeten Substanzen

Die eingesetzten Konzentrationen der Substanzen wurden aus den unter Kapitel 5.2 gezeigten Vitalitätstests ermittelt und lagen im Bereich der halbmaximalen Hemmung der Zellproliferation. Die verwendeten Konzentrationen für LPS und IFN- γ wurden außerdem durch Literaturangaben gestützt [59]. Bei den durchgeführten Vitalitätsbestimmungen (Kap. 4.6) wird die Vitalität der Zelle durch die Reduktion des Substrates (WST-1) durch mitochondriale Dehydrogenasen zu einem löslichen Formazansalz gezeigt, welche sich im Mikrotiterplattenreader messen ließ. Dabei war die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber den Substanzen zu den kürzeren Inkubationszeiten niedriger als zu den längeren Inkubationszeiten und es zeigte sich eine deutliche Verschiebung der IC₅₀-Werte von jeweils etwa einer Zehnerpotenz zwischen den verschiedenen Zeitpunkten (>18 Stunden Inkubation). Die nicht vorhandene oder niedrigere Toxizität nach kürzeren Inkubationszeiten lässt sich dadurch erklären, dass die Zellen eine Teilungsrate von etwa 20 Stunden besitzen, d.h. in den ersten drei gewählten Zeitpunkten, 30 Minuten, 2 bzw. 18 Stunden noch keine Proliferation stattgefunden hat, in der eine Beeinflussung nachgewiesen werden könnte. Nach dieser Zeit wurden die Einflüsse der Substanzen auf das Cytoskelett, durch eine niedrigere Vitalität der Zellen und damit eine höhere Toxizität der Substanzen, deutlich. Die Konzentrationen (vergleiche Tabelle 8) wurden für die Zeitpunkte der Analysen, in der Regel 18 Stunden, gewählt.

6.3 Einfluss der Substanzen auf die Produktion von Stickstoffmonoxid

In ihrer inaktiven Form besitzen murine Makrophagen keine Stickstoffmonoxidsynthase (NOS), diese wird erst durch die Stimulation der Zellen mit externen Stimuli, z.B. LPS oder IFN- γ , transkribiert und translatiert. In diesem Fall spricht man von der induzierbaren NOS (iNOS). Die gebildeten reaktiven Stickstoffradikale stellen nicht nur für eindringende Organismen, sondern auch für wirtseigene Zellen eine Gefährdung dar [66]. Es muss somit gewährleistet sein, dass die Zellen dadurch keinen Schaden nehmen, der die Ergebnisse verfälschen würde. In diesem Falle ist die Beeinträchtigung für die Zellen gering, da das ausgeschleuste NO im Zellkulturmedium sofort mit Sauerstoff und Wasser zu Nitrit bzw. Nitrat reagiert, welches im Zellüberstand nachweisbar ist. Nicht alle bekannten murinen Makrophagenzelllinien, jedoch die in dieser Arbeit verwendeten RAW 264.7-Zellen, sind in der Lage nach Stimulation mit den oben genannten Substanzen, die iNOS zu bilden [63]. Nach Inkubation der Zellen stieg die NO-Produktion stark an und erreichte ihr Maximum in einen Konzentrationsbereich von 30-50 μM (vergleiche Tabelle 5). Dies entsprach den Literaturangaben [48], und deutete auf eine normale Funktionsweise der Makrophagen hin. Es konnte auch eine deutliche Abhängigkeit der NO-Bildung von der Konzentration und der Inkubationszeit der eingesetzten Substanzen gezeigt werden (Abb. 35 und 36). Die dabei aufgetretene höhere NO-Bildung nach LPS-Behandlung lässt sich auf die Herkunft der Substanz zurückführen. LPS als Bestandteil der Bakterienzellwand stellt eine reelle Bedrohung des Organismus zu einem frühen Zeitpunkt der Infektion dar und sollte eine schnelle Reaktion der Makrophagen hervorrufen, wohingegen die Stimulation durch IFN- γ in der Regel durch körpereigene Immunzellen zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion erfolgt und eine weniger starke Reaktion erfordert.

Die Tatsache, dass nach Zugabe der gewählten Naturstoffe keine oder nur eine sehr geringe NO-Produktion (1-3 μM , Tab. 5) nachzuweisen war, lässt die Vermutung zu, dass die Naturstoffe keine steigernde und zum Teil sogar eine hemmende Wirkung auf die NO-Produktion besitzen. Die Hemmung wird deutlich, wenn die durch LPS-Stimulation der Zellen induzierte NO-Bildung durch Zugabe von Disorazol A, Epothilon B und Vioprolid A auf etwa 50 % der vorher erzielten Werte zurück gingen (vergleiche Kap. 5.3.4). Die Substanzen wirkten dabei jeweils in den höchsten gewählten Konzentrationen und bereits unterhalb der in den Toxizitätstests ermittelten IC_{50} -Werte. Damit lässt sich eine toxische Wirkung der Substanzen als Ursache dieser Hemmungseffekte ausschließen. Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass die Substanzen neben ihrem bekannten Target, dem Tubulin (Ausnahme Vioprolid: bislang unbekanntes Target), noch andere Zielproteine

besitzen, welche möglicherweise in der Signalkaskade zu finden sind, die zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und somit zur Aktivierung der iNOS führen. Die Konzentration von Disorazol lag dabei, wie bei allen Versuchen, deutlich niedriger als bei den anderen Substanzen, was auf die bessere Wirksamkeit zurückzuführen war, welche sich auch in einer höheren Toxizität äußerte. Dies deckt sich auch mit vorangegangenen Experimenten zur starken Toxizität von Disorazol in Bezug auf andere Zelllinien wie die Makrophagenzelllinie J774A.1 [eigene Daten, nicht gezeigt] und die Fibroblastenzelllinie L929 [71].

Der Einsatz des Kinaseinhibitors Purvalanol B zeigte eine ähnliche, jedoch stärkere Hemmung der NO-Produktion (Abb. 35 und 39). Die Nitritbildung wurde dabei auf Hintergrundniveau gesenkt und die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass der Inhibitor möglicherweise in die Signalkaskade des NF- κ B-Weges eingreift und eine Bildung der iNOS verhindert. Diese Untersuchungen könnten durch den Einsatz von spezifischen Inhibitoren, die auf Kinasen in diesem Signalweg wirken, bestätigt werden. Bei den bekannten Targets des Inhibitors handelt es sich um Kinasen, welche den Zellzyklus steuern: die Cyclin-abhängigen Kinasen [72]. Zusätzlich dazu ist aus der Literatur [73] bekannt, dass die Substanz auf die p42/p44 MAPKinase wirkt und diese hemmt. Die p42/p44 steht, auch bekannt unter dem Namen ERK2 bzw. ERK1, am Ende des MEK-Signalweges [74], welcher zur Aktivierung von verschiedenen inflammatorischen Genen, z.B. der iNOS, führt. Durch die Blockade dieser Kinase kann das Signal nicht weitergeleitet werden, die iNOS wird nicht gebildet, und es wird kein NO produziert und sekretiert.

6.4 Einfluss der Substanzen auf die Sekretion der Cytokine

Die kommerziell erworbenen ELISA Kits mussten in ihrer Anwendung nicht mehr optimiert werden und konnten direkt verwendet werden. Im Gegensatz dazu erforderte der eigenständig zusammengesetzte Interleukin 6 ELISA eine genaue Optimierung. Dabei führten die als Positivkontrollen verwendeten Stimulationen mit LPS und IFN- γ stets zu einer starken Produktion von IL-6 [59].

TNF- α ist ein von Makrophagen als Reaktion auf eine bakterielle Infektion gebildetes Cytokin. Es wird in der Regel durch die Erkennung eines Endotoxins gebildet und von der Zelle ins Medium sekretiert. Dort wirkt es auf die Makrophagen selbst sowie auf andere Zellen des Immunsystems und induziert die Bildung spezieller Akute-Phase-Proteine, welche als erste Antwort auf das Eindringen von Mikroorganismen benötigt werden. Es wirkt synergistisch mit IFN- γ antiviral und kann auch Tumore abtöten [2]. Da TNF- α als Reaktion auf die Stimulation mit LPS gebildet wird, sollte er in dieser Arbeit als eines der Standard-

cytokine einer Entzündungsreaktion bestimmt werden. Als zweites Cytokin wurde IL-6 (s. u.) untersucht.

Die unter Kap. 5.4 durchgeführten Versuche zeigten, dass die Substanzen mit Ausnahme von Tubulysin A keinen Effekt auf die TNF- α Produktion hatten. Die erwartete starke Produktion nach Zugabe von LPS und IFN- γ lag dabei mit >2450 pg/mL und 1400 pg/mL deutlich höher als nach Tubulysin-Behandlung, welche zudem in den Wiederholungen der Versuche auch stark schwankten (200-1000 pg/mL). Die in Abbildung 44 dargestellte Konzentrationsabhängigkeit zeigt, dass ein leichter Anstieg nach Tubulysin-Behandlung bei 20 ng/mL zu erkennen ist, der nachfolgende 100 ng/mL Wert sollte aufgrund der enormen Fehlerbalken vernachlässigt werden. Zur Zeitabhängigkeit lässt sich sagen, dass die LPS-Stimulation bereits nach 3 Stunden zu einem starken und ebenfalls konzentrationsabhängigen Anstieg der TNF- α Produktion führte. Nach 24 Stunden Inkubation stieg diese Konzentration noch einmal deutlich an (Abb. 43). Die TNF- α Konzentrationen nach Stimulation mit Tubulysin zeigten erst nach 24 Stunden einen deutlichen Anstieg (Abb. 44), der jedoch deutlich höhere Werte erzielte als die Einzelbestimmungen nach 18 Stunden (Tab. 8). Es ließ sich eine leichte Konzentrationsabhängigkeit nachweisen, wobei die großen Fehlerbalken eine genauere Untersuchung schwierig machten. Der Abfall zum letzten Punkt der Konzentrationsreihe lässt sich dadurch erklären, dass diese Konzentration bereits in den toxischen Bereich des Tubulysins fiel. Wie schon bei der NO-Bildung lässt sich aber auch für diese Ergebnisse zusammenfassend sagen, dass die meisten Substanzen keinen Effekt besaßen und die Reaktion auf LPS deutlich schneller und heftiger erfolgte als auf IFN- γ und Tubulysin, was sich durch die tatsächlichere Gefahr des bakteriellen Zellwandbestandteils erklären lässt.

Das ebenfalls nachgewiesene IL-6 ist nicht nur als Mediator der Immunantwort zu betrachten, sondern auch als Cytokin, welches einen Einfluss auf die Hämatopoese, die akute Phase einer Infektion, sowie die Entzündungsreaktion besitzt [61]. Zudem spielt IL-6 eine große Rolle bei chronischen Entzündungen, wie der Glomerulonephritis, einer autoimmunen Entzündung der Niere. In den durchgeführten Versuchen zeigte sich, dass IL-6 lediglich nach Stimulation mit LPS und IFN- γ , sowie in geringerem Maße nach Behandlung der Zellen mit Tubulysin A (mit 200-300 pg/mL etwa um ein zehnfaches geringer als bei LPS-Stimulation) vermehrt gebildet wurde. Die Produktion von IL-6 nach Zugabe von LPS und IFN- γ lag dabei im Bereich der Literaturangaben [59]. Da das Tubulysin in einer nichttoxischen Konzentration eingesetzt wurde, handelt es sich um einen tatsächlich stimulatorischen Effekt der Substanz. Daraus lässt sich die Schlussfolgerung ziehen, dass vermutlich der NF- κ B Signalweg angeschaltet wird. Es ist bekannt, dass als Reaktion auf eine LPS-Stimulation der Transkriptionsfaktor NF- κ B unter

anderem das Gen für Interleukin 6 aktiviert. Alles in allem kann gesagt werden, dass Einflüsse der verwendeten Substanzen mit Ausnahme von LPS, IFN- γ und Tubulysin, nicht vorhanden waren.

6.5 Einfluss der Substanzen auf die Phagozytose

Die Phagozytose, also die Aufnahme von Partikeln aus der Umgebung der Zellen, ist einer der zentralen Aufgaben der im Körper befindlichen Makrophagen. Sie stellt den Abbau von schädlichem und überflüssigem organischen Material sicher. Dabei unterscheidet sich der Abbau von Bakterien oder anderen Mikroorganismen vom Abbau körpereigener, abgestorbener Zellen durch die Aktivierung inflammatorischer Signalwege und der Geschwindigkeit der nachfolgenden Verdauungsreaktion [69].

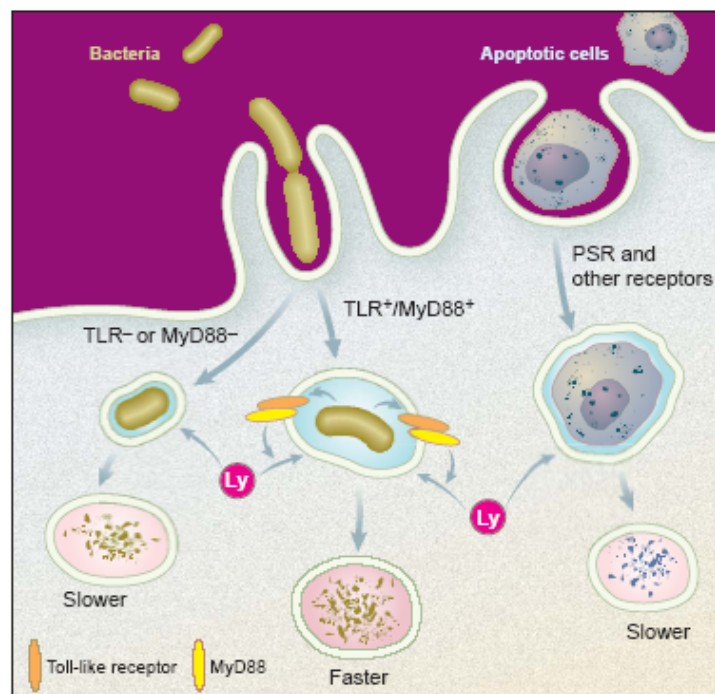


Abb. 58: Phagosomenreifung und TLR Signalweg [69]

Während der Phagozytose wird die Zellmembran der Zellen um die abzubauenen Partikel ausgestülpt (Abb. 58), dazu sind Veränderungen des Cytoskeletts notwendig. Da die verwendeten Substanzen als Zielprotein in der Zelle die Tubulinfilamente der Mikrotubuli besitzen, sollte untersucht werden, ob die Behandlung der Zellen mit diesen Substanzen zu einer Veränderung der Phagozytoseaktivität führt. Diese Vermutung konnte mit Hilfe der durchgeführten in vitro Tests nicht bestätigt werden.

Die Versuche zur Phagozytoseaktivität (siehe Kap 5.6.1) sollten den günstigsten Zeitpunkt zur Analyse bestimmen. Nach etwa 6 Stunden ging die Aufnahme der Bakterien in die

Sättigung über. Der gewählte Zeitpunkt von 90 Minuten entspricht allerdings eher den tatsächlichen physiologischen Bedingungen in einem infizierten Organismus und wurde auch aufgrund der ausreichend hohen Signale gewählt.

Bei Vioprolid zeigten sich keine Effekte auf die Phagozytoseaktivität, was die Vermutung nahe legt, dass das Target von Vioprolid nicht direkt an der Phagozytose beteiligt ist. Purvalanol als Kinaseinhibitor hatte ebenfalls keinen Einfluss auf den Ablauf der Bakterienaufnahme. Bei den anderen Substanzen (Disorazol, Epothilon und Tubulysin) zeigten sich nur in den höchsten eingesetzten Konzentrationen (4, 20, 100 ng/mL) und den längsten Inkubationszeiten (70 Stunden) negative Effekte auf die Phagozytose. Dies korrelierte mit der Toxizität der Substanzen und deren hemmendem Effekt auf die Mikrotubuli der Zellen. Besonders ist hier das Tubulysin zu erwähnen, welches die Phagozytose bereits in der geringsten gewählten Konzentration (0,8 ng/mL, 70 Stunden) hemmte. Diese Konzentration lag unterhalb des IC_{50} und die Ergebnisse müssen deswegen als eindeutiger Effekt der Substanz berücksichtigt werden. Aus Literaturangaben [75] ist bekannt, dass beim ersten Schritt der Phagozytose, also der Ausstülpung der Zellmembran, hauptsächlich die Actinfilamente des Cytoskeletts beteiligt sind. Aus diesem Grund wurde in den Versuchen zur Phagozytoseaktivität Cytochalasin B als Toxin zur Negativkontrolle verwendet, welches gezielt die Actin-Polymerisation blockiert und somit die Phagozytose unmöglich macht [2]. Die Mikrotubuli, welche die Haupttargets der verwendeten Naturstoffe sind, werden erst benötigt, wenn die entstandenen Vesikel innerhalb der Zellen transportiert werden sollen. Diese Tatsachen erklären die Nicht-Beeinflussung der Phagozytose durch die gewählten Substanzen. Der Einfluss von Tubulysin A lässt darauf schließen, dass die Substanz ein weiteres Target außer Tubulin besitzt. Untersuchungen zur Wanderung der Vesikel von der Zellmembran zu den Lysosomen und die Verschmelzung mit diesen zu den Phagolysosomen, könnten eine Hemmung der Mikrotubuli durch die verwendeten Substanzen zeigen (vergleiche Kap. 8).

Die mikroskopische Betrachtung der Phagozytose unterstützte die Beobachtungen der fluoreszenzbasierten Analyse der Phagozytose lediglich geringfügig, da in den vorliegenden Aufnahmen nur erkennbar war, dass die Bakterien sich an der Zellmembran der Makrophagen anlagerten; ob dies intra- oder extrazellulär stattfand, war nicht bestimmbar. Versuche, die außerhalb der Zellen liegenden Bakterien mit Trypanblau zu quenchen und nur die in den Zellen befindlichen Bakterien sichtbar zu machen, scheiterten an der geringen Fluoreszenz, welche zwar im Cytofluor messbar war, jedoch im mikroskopischen Bild aufgrund der geringeren Empfindlichkeit verloren ging. Diese Beobachtungen könnten mit Hilfe von

anderen Farbstoffen, welche erst im Inneren der Makrophagen zu leuchten beginnen, eindeutig geklärt werden.

6.6 Analyse der Proteine der behandelten Zellen

Die Proteinanalyse mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese ist ein unverzichtbarer Bestandteil bei der Untersuchung der komplexen intrazellulären Proteingemische. Dabei stellt die Auswertung der hergestellten Proteingele die eigentliche Herausforderung und den größten zeitlichen Aufwand dieser Methode dar [47]. Bevor die Proteine in der zweidimensionalen Gelelektrophorese getrennt werden können, sollte genau geplant werden, welche Proteine analysiert werden sollen. Im vorliegenden Fall sollte in erster Linie die Phosphorylierung der Proteine untersucht werden, da diese die enzymatische Aktivität, die Lokalisation innerhalb der Zelle, die Bildung von Komplexen oder die Degradation der Proteine reguliert [56]. Die Phosphorylierung der Proteine stellt im Gegensatz zu den meisten anderen der über 200 bekannten posttranslationalen Modifikationen eine reversible Veränderung der Proteine dar und ist aufgrund ihrer Bedeutung für die Aktivität der Proteine eine der am häufigsten untersuchten Proteinveränderungen. Dabei haben sich die Untersuchungsmethoden in den letzten Jahren stark verändert. Die anfängliche Markierung der Phosphatgruppen mit radioaktiv markiertem Phosphor wurden durch Fluoreszenzfarbstoffe bzw. durch spezifisch gegen phosphorylierte Aminosäuren gerichtete und markierte Antikörper ersetzt [56]. Da die phosphorylierten Proteine in der Zelle in der Regel nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen, ist eine Anreicherung dieser Proteine vor der Analyse ein notwendiger Schritt. Zu diesen Problemen der Betrachtung der phosphorylierten Proteine kommt der Aspekt, dass Proteasen, Kinasen und Phosphatasen ständig aktiv sind und den Phosphorylierungsstatus der Proteine verändern, wenn diese Enzyme nicht im Moment der Zelllyse inaktiviert werden.

Die Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese stellt eine der üblichen Herangehensweisen an die Untersuchung von Proteinproben dar. Dabei werden in der Regel zwei Proteinproben miteinander verglichen. Die Phosphorylierung eines Proteins wird in diesem Fall durch die Verringerung des für das Protein spezifischen pI deutlich, d.h. der entstehende Proteinspot verschiebt sich zu einem niedrigeren pH-Wert. Die Methode der 2D-Gelelektrophorese ist allerdings auf die Analyse von Proteinen beschränkt, welche eine Größe von 10-100 kDa aufweisen und nicht zu gering konzentriert vorliegen. Alle Proteine, die diese Anforderungen nicht erfüllen, können mit dieser Methode nur unzureichend nachgewiesen werden [56]. Als alternative Methode soll der Immuno- bzw. Western Blot erwähnt werden,

welche in der Sensitivität mit der Silberfärbung von Proteinen zu vergleichen ist. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass bestimmte Proteine gezielt angefärbt werden können, sofern die erforderlichen Antikörper zur Verfügung stehen. Diese Verfügbarkeit der AKs und die Variabilität der auf die Blotmembran übertragenen Menge an Protein begrenzt jedoch auch diese Methode auf eine qualitative Analyse [56]. Eine weitere Methode ist die direkte Anfärbung der Proteine bzw. der Phosphatgruppen mit einem Fluoreszenzfarbstoff, der Pro-Q Diamond genannt wird. Dieser kann z.B. mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYPRO Ruby kombiniert werden, der zur Markierung aller Proteine verwendet wird. So können in einem Gel sowohl die Proteine als auch deren Phosphorylierungen dargestellt werden. Obwohl diese Methode in der Lage ist auch in komplexen Proteingemischen zwischen phosphorylierten und nicht phosphorylierten Proteinen zu unterscheiden, ist die Sensitivität nicht ausreichend hoch für nur gering konzentrierte Proteine [56].

Da alle erwähnten Methoden zum großen Teil daran scheitern, dass die gesuchten Proteine in zu geringer Konzentration vorliegen, sind Anstrengungen nötig, die zu einer Anreicherung der phosphorylierten Proteine bzw. Peptide führen. Dabei können verschiedene Techniken zum Einsatz kommen, z.B. die immobilisierte Metall Affinitäts Chromatographie (IMAC), welche die hohe Affinität von Phosphatgruppen zu Kationen wie Zn^{2+} , Fe^{3+} und Ga^{3+} ausnutzt und die Phosphoproteine von den anderen Proteinen trennt. Als Problem soll hierbei erwähnt werden, dass Proteine, die viele saure Aminosäuren enthalten, ebenfalls eluiert werden. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen phosphorylierte Aminosäuren können auch die Phosphoproteine von den restlichen Proteinen des Zelllysats getrennt werden. Diese Methode wird als Immunopräzipitation bezeichnet und nutzt die spezielle Bindung der Antikörper zur Isolierung von Phosphoproteinen aus komplexen Proteingemischen [56]. Als limitierender Faktor dieser Methode tritt hierbei der Aspekt auf, dass nicht ausreichend kommerziell erhältliche Antikörper gegen die phosphorylierten Serin- und Threonin-Reste der Proteine existieren.

Die Identifikation der Proteinphosphorylierungen erfolgt in der Regel über die Massenspektrometrie (MS), bei der die Proteine nach einer Zerlegung in Peptide analysiert werden. Durch den Vergleich der gefundenen Peptide mit vorhandenen Datenbanken kann ein Protein identifiziert werden. Eine Verschiebung der Masse um 80 Da deutet dabei jeweils auf eine Phosphorylierung hin [56]. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Analyse der phosphorylierten Proteine eine relativ schwierige Untersuchung darstellt, bei der viele verschiedene Eigenschaften der Proteine, wie ihre geringe Konzentration, berücksichtigt werden müssen. Trotzdem stellt diese Modifikation der Proteine einen zentralen Punkt in den

zellulären Prozessen dar, da sie für die Aktivität und Lokalisation der verschiedensten Proteine verantwortlich ist. Um zu einer optimalen Analyse der Phosphoproteine sollten die gängigen Methoden miteinander kombiniert werden (Abb. 59).

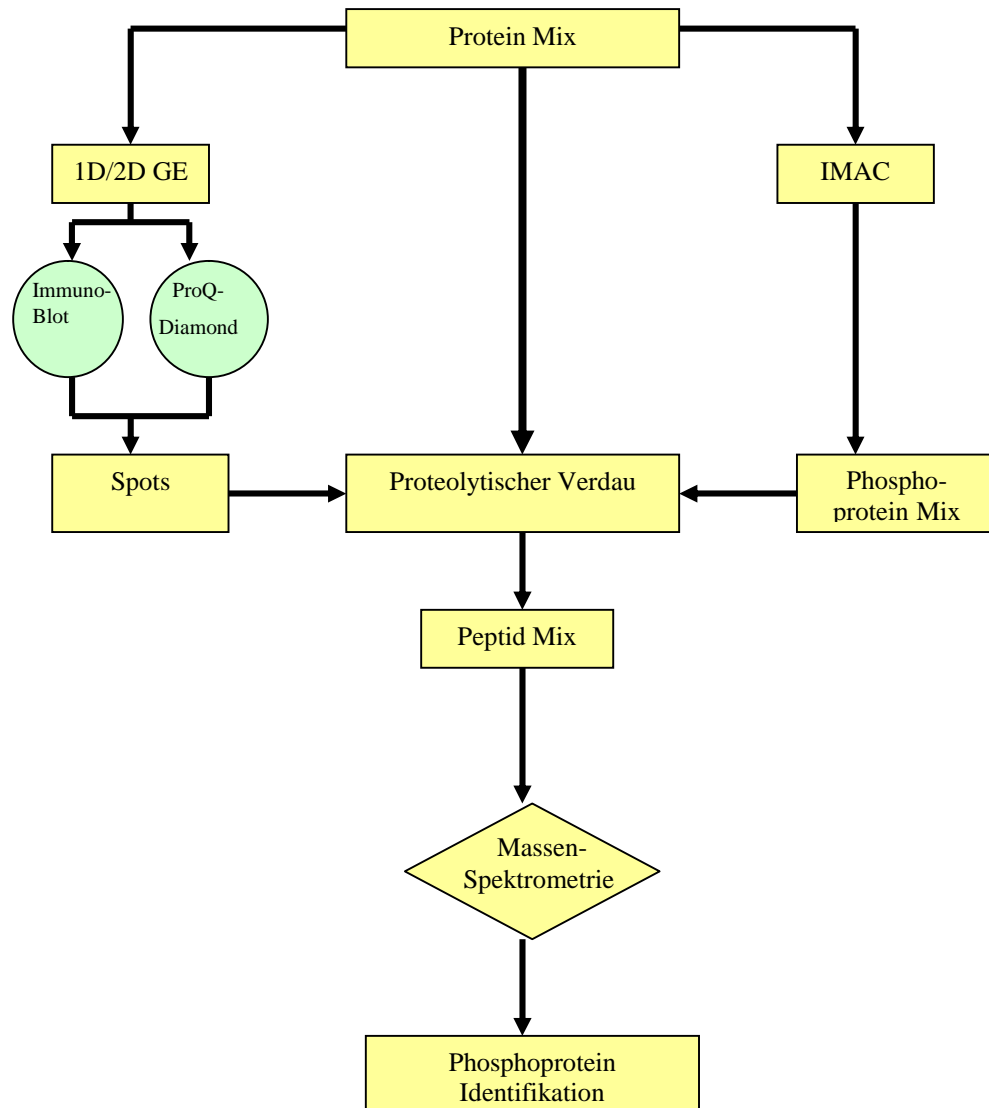


Abb. 59: Schematische Darstellung der Verknüpfungen der einzelnen Methoden [56]

Die in dieser Arbeit verwendeten Techniken beschränkten sich auf die Gewinnung, Trennung und Anfärbung der zu untersuchenden Proteine. Eine weitere Analyse erfolgte nicht. Die gewünschten Proteine lagen in zu geringen Mengen vor, um sie in ausreichendem Maße analysieren zu können. Um eine größere Ausbeute an Proteinen sicher zu stellen, müssten deutlich größere Gesamtzellzahlen angestrebt werden. Die Behandlung dieser großen Zellmengen stößt dabei allerdings an ihre Grenzen, da die verwendeten Naturstoffe in den

meisten Fällen nur in sehr geringen Mengen vorliegen und nicht im Grammbereich produziert werden können. Die Art der Proteinanalyse des gesamten Proteoms ist auch im Bezug auf die relevanten Proteine nicht sinnvoll. Stattdessen sollte für weitere Versuche eine Vorauswahl bzw. eine Trennung der interessanten Proteingruppen angestrebt werden. Dies kann durch eine Begrenzung auf einen bestimmten pH-Bereich erfolgen, der durch die eingesetzten IPG-Streifen oder durch die bereits im oberen Teil erwähnte Trennung durch bestimmte Modifikationen an den Proteinen erzielt werden kann. Zudem sollten die Zellen synchronisiert werden, um sich in identischen Zellzyklusstadien zu befinden und genaue Vergleiche der Experimente möglich zu machen.

7. Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen besitzen generell ein großes Potential, um in der klinischen Forschung weiterhin eingesetzt zu werden. Als vielversprechendste Substanz hat sich dabei das Epothilon B herausgestellt. Dieses, bereits 1987 aus dem Myxobakterium *Sorangium cellulosum* isolierte Antitumormittel wird zur Zeit in den USA als Krebsmedikament gegen bereits metastasierten und resistenten Brustkrebs in den Markt eingeführt [68]. Es wirkt in Körperzellen stabilisierend auf die Mikrotubuli, besonders in sich schnell teilenden Zellen, hindert diese dadurch an der Zellteilung [62] und sorgt für ein Absterben und einen Abbau der Zellen [68]. Eine andere aus *Sorangium cellulosum* isolierte Substanz, welche der Wirkung von Epothilon in der biologischen Aktivität gegenüber filamentösen Pilzen, aber nicht gegenüber Hefen ähnelt, ist Disorazol A. Es sorgt allerdings durch die Verhinderung der Polymerisation der Tubulinmoleküle für eine Destabilisierung der Mikrotubuli; seine Toxizität lag in den ersten Untersuchungen 5-6 Zehnerpotenzen über allen bis dahin bekannten Naturstoffen [10]. Es blockiert die Mitose und induziert, wie das Epothilon, die Apoptose der Zellen [6]. Die deutlich höhere Toxizität zeigte sich auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, weshalb hier eine niedrigere Konzentration gewählt wurde als bei den übrigen Naturstoffen. Das ebenfalls verwendete Tubulysin wurde aus *Archangium gephyra* isoliert und besitzt, genau wie das Disorazol, eine destabilisierende Wirkung auf die Mikrotubuli, ist aber bei weitem nicht so toxisch gegenüber tierischen Zellen. Als letzte verwendete Substanz ist das Vioprolid A zu nennen, welches aus dem Myxobakterium *Cystobacter violaceus* isoliert wurde. Es handelt sich dabei um ein Fungizid, dessen Haupttarget noch unbekannt ist [64].

In dieser Arbeit sollten die Einflüsse verschiedener Naturstoffe aus Myxobakterien auf die Funktionen von Mausmakrophagen getestet werden. Dabei stellte sich heraus, dass die verwendeten Substanzen, mit Ausnahme des Tubulysin A, keine Auswirkungen auf die inflammatorischen Funktionen der Makrophagen besitzen. Zur Überprüfung der durchgeführten Versuche wurden LPS und IFN- γ als Standards verwendet, von denen bekannt war, dass sie die Cytokinproduktion genau wie die NO-Bildung steigern. Die Behandlung der Zellen mit den anderen verwendeten Substanzen Epothilon B, Vioprolid A und Disorazol A allein beeinflusste jedoch weder die Stickstoffmonoxidbildung noch die Produktion der entzündungsspezifischen Cytokine IL-6 und TNF- α . Die Kombination der Substanzen mit LPS führte zu einer Hemmung der NO-Bildung, was auf eine Inhibitorfunktion der Substanzen hindeutet. Auch der Ablauf der Phagozytose wurde von den Substanzen nicht beeinträchtigt. Lediglich die Inkubation der Zellen mit Tubulysin A zeigte einen Einfluss auf

die Cytokinproduktion, sowohl bei IL-6 als auch beim TNF- α , jedoch nicht in der NO-Produktion. Die Phagozytoseaktivität wurde von Tubulysin nach 70 stündiger Inkubation in allen gewählten Konzentrationen beeinflusst und lässt somit den Schluss zu, dass Tubulysin möglicherweise neben seinem Haupttarget Tubulin noch andere Zielproteine besitzt, welche an der Phagozytose bzw. in Signalwegen beteiligt sind, welche zur Produktion von IL-6 und TNF- α führen. Die Forschungen an dieser Substanz sollten in jedem Falle fortgesetzt werden. Die bis jetzt bekannten Eigenschaften der Substanzen legen eine Verwendung als Krebstherapeutika nahe, da sie hauptsächlich auf Tumorzellen wirken, die sich schneller als die nicht entarteten Zellen teilen. Deshalb sollten vor allem die Untersuchungen von Disorazol in dieser Richtung weiter geführt werden. Die Untersuchung vom Vioprolid sollte besonders in Richtung einer Targetidentifizierung vorangetrieben werden, um eine Verwendungsmöglichkeit für diesen Naturstoff zu finden. Die Verwendungsmöglichkeit von Tubulysin als immunstimulatorischer Wirkstoff oder als Krebstherapeutikum muss durch weitere Analysen, auch mit Hilfe der Proteinanalyse, getestet und bestätigt werden. Dabei müssen allerdings die speziellen Anforderungen, wie die nur geringe Verfügbarkeit des Naturstoffs sowie die niedrige Konzentration der zu untersuchenden Proteine, berücksichtigt werden, welche die Proteinanalyse in dieser Arbeit und mit den hier verwendeten Methoden unmöglich machten.

8. Ausblick

Die durchgeführten Versuche zeigten einen Einblick in die Wirkungsweise der Makrophagen nach einer Behandlung mit verschiedenen Substanzen, welche die Immunantwort fördern, hemmen oder nicht beeinflussen. Dabei ist in weiteren Versuchen zu klären, an welcher Stelle der Signalkaskaden die verwendeten Stoffe genau eingreifen. Zu diesem Zweck könnte die zweidimensionale Gelelektrophorese ein nützliches Werkzeug sein. Dazu sollten allerdings vor der Analyse der Proben, die interessanten Proteine, in diesem Falle die phosphorylierten, von den anderen separiert werden, um eine Analyse zu erleichtern und zu auswertbaren Gelen zu gelangen. Diese Vorauswahl der signifikanten Proteine könnte mit Hilfe verschiedenster Methoden, wie der Phosphoprotein Aufreinigungs-Kits von Qiagen erfolgen. Auch die Analyse der Proben mit Hilfe der Western Blot Technik wäre als eine alternative Methode einsetzbar, wenn die erforderlichen Antikörper für diese Experimente verfügbar sind. Als weiterer Ansatz könnten spezifische Inhibitoren zum Einsatz kommen, um einen Einblick darüber zu gewinnen, an welcher Stelle der Signalkaskaden die verwendeten Stoffe eingreifen und auf die behandelten Zellen wirken. Eine weitere Untersuchung der Phagozytoseaktivität könnte weitere Aufschlüsse über die Wirkungsweise der Substanzen erzielen. Dabei sollte das Hauptaugenmerk jedoch nicht auf den Beginn der Phagozytose, sondern auf den folgenden Transport und die Weiterprozessierung der gebildeten Vesikel liegen, da hier die Mikrotubuli in Erscheinung treten und anzunehmen ist, dass eine Blockade der Tubulinbestandteile hier eine Wirkung zeigen müsste. Eine Möglichkeit, die Hemmung nachzuweisen, wäre die Fluoreszenzfärbung der Zellen mit dem sogenannten Lysotracker (Invitrogen), welcher saure Kompartimente der Zelle anfärbt. Die Fluoreszenz der phagozytierten Partikel überlagert sich nach Aufnahme in die Lysosomen mit dem Lysotracker und zeigt eine andere Fluoreszenz als vorher.

Zusätzlich zu der weiteren Analyse der in dieser Arbeit verwendeten Naturstoffe lassen sich die durchgeführten Versuche wie der Stickstoffmonoxidnachweis, die Cytokin-ELISAs oder der Phagozytose-Assay problemlos auf andere Naturstoffe übertragen. In bereits durchgeführten Versuchen stellte sich heraus, dass es Naturstoffe gibt, die ähnlich wie der Kinaseinhibitor Purvalanol B keine toxische Wirkung auf die Zellen zeigen, aber dennoch zu Veränderungen in den Zellen führen und Reaktionen wie die Hemmung der Produktion von NO hervorrufen. Diese Ergebnisse zeigen, dass eine toxische bzw. nicht toxische Wirkung nicht die einzige Eigenschaft einer Substanz sein muss. Es ist stattdessen nötig, weitere Auswirkungen auf die Funktionen der behandelten Zellen zu untersuchen. Besonders in

Hinblick auf einen Einsatz als Medikament sollten diese Einsicht nicht vernachlässigt werden, da auch eine nicht toxische Substanz schwerwiegende Folgen auf die Funktionsweisen des Organismus besitzen kann.

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	(a) Chemische Struktur von Vioprolid A, (b) chemische Struktur von Epothilon B, (c) chemische Struktur von Tubulysin A, (d) chemische Struktur von Disorazol A.....	Seite 2
Abb. 2:	Schematische Darstellung eines Mikrotubulifilaments.....	Seite 3
Abb. 3:	vereinfachte Darstellung der Immunantworten.....	Seite 6
Abb. 4:	Schematische Darstellung der Hämatopoese.....	Seite 8
Abb. 5:	Schematische Darstellung der Interaktion zwischen aktivierten Makrophagen und anderen Zellen des Immunsystems.....	Seite 11
Abb. 6:	Schematische Darstellung der Aufnahme und des Abbaus von Partikeln in eine Zelle.....	Seite 12
Abb. 7:	Reaktion von L-Arginin zu L-Citrullin.....	Seite 13
Abb. 8:	Chemische Struktur des Lipopolysaccharids (LPS).....	Seite 14
Abb. 9:	Schematische Darstellung verschiedener TLRs und den folgenden Signalwegen.....	Seite 15
Abb. 10:	Signalweiterleitung nach Aktivierung eines Toll Like Rezeptors.....	Seite 18
Abb. 11:	Schema einer Neubauer improved Zählkammer.....	Seite 31
Abb. 12:	Zellkultur nach 3 Tagen Wachstum bei 40facher Vergrößerung.....	Seite 32
Abb. 13:	Fluoreszenzfärbung der <i>E.coli</i> Zellen mit CSFE.....	Seite 34
Abb. 14:	Skizze der Plattenbelegung für WST-Test.....	Seite 35
Abb. 15:	Darstellung der Chemischen Reaktion des WST zu Formazan.....	Seite 35
Abb. 16:	Schematische Darstellung des Phagozytoseassays.....	Seite 37
Abb. 17:	Schematische Darstellung eines Sandwich ELISA.....	Seite 38
Abb. 18:	Darstellung der chemischen Reaktion zum Nachweis von Nitrit mit Hilfe der Griess-Reagenz.....	Seite 41
Abb. 19:	Schematische Darstellung der zweidimensionalen Gelelektrophorese.....	Seite 42
Abb. 20:	Gießkammer der Protean Plus Serie von BioRad.....	Seite 43
Abb. 21:	schematische Darstellung eines IPG-Streifens (pH3-10).....	Seite 44
Abb. 22:	Gel-Tray der IEF-Zelle der Protean Plus Serie von BioRad.....	Seite 44
Abb. 23:	Protean Plus Dodeca Cell der Firma BioRad.....	Seite 46
Abb. 24:	Wachstumskurve der Kultivierung der Zelllinie RAW 264.7.....	Seite 48

Abb. 25:	Vergleich von Zellzahl und Proteinmenge der Zelllinie RAW 264.7	Seite 49
Abb. 26:	RAW 264.7-Zellen am ersten Tag des Wachstums bei 10facher Vergrößerung	Seite 50
Abb. 27:	RAW 264.7-Zellen am dritten Tag des Wachstums bei 40facher Vergrößerung	Seite 50
Abb. 28:	Einfluss der Inkubationszeit auf die Toxizität von LPS	Seite 52
Abb. 29:	Einfluss der Inkubationszeit und der Konzentration auf die Toxizität von Disorazol A	Seite 53
Abb. 30:	Einfluss der Inkubationszeit und der Konzentration auf die Toxizität von Epothilon B	Seite 53
Abb. 31:	Einfluss der Inkubationszeit und der Konzentration auf die Toxizität von Vioprolid A	Seite 54
Abb. 32:	Einfluss der Inkubationszeit und der Konzentration auf die Toxizität von Tubulysin A	Seite 55
Abb. 33:	Einfluss der Inkubationszeit und der Konzentrationen auf die Toxizität von Purvalanol B	Seite 56
Abb. 34:	Kalibriergerade für den Nachweis von Nitrit mit Hilfe des Griess-Reagenz	Seite 57
Abb. 35:	Konzentrationsabhängigkeit nach Stimulation mit LPS bzw. Interferon γ und Purvalanol B	Seite 59
Abb. 36:	Zeitabhängigkeit der Nitritbildung nach Inkubation mit LPS und Interferon γ	Seite 60
Abb. 37:	Nitrit nach Inkubation der Zellen mit Disorazol A und Epothilon B und der Kombination mit LPS (100 ng/mL)	Seite 61
Abb. 38:	Nitrit nach Behandlung der Zellen mit Tubulysin und Vioprolid und der Kombination mit LPS (100 ng/ml)	Seite 61
Abb. 39:	Nitritbildung nach Inkubation der Zellen mit LPS und Interferon γ bzw. der Kombination mit Purvalanol B	Seite 62
Abb. 40:	Kalibriergerade des TNF- α ELISA Kits	Seite 65
Abb. 41:	TNF- α Konzentration nach Stimulation mit Purvalanol B und Vioprolid A	Seite 66
Abb. 42:	TNF- α Konzentration nach Stimulation mit Tubulysin A und Disorazol A	Seite 66

Abb. 43:	TNF- α Konzentration nach Behandlung der Zellen mit LPS.....	Seite 67
Abb. 44:	TNF- α Konzentration nach Inkubation der Zellen mit Tubulysin A	Seite 68
Abb. 45:	Kalibriergerade des IL-6 ELISA	Seite 69
Abb. 46:	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der IL 6 Produktion nach Inkubation mit Tubulysin A	Seite 70
Abb. 47:	Zeitlicher Ablauf der Phagozytose	Seite 71
Abb. 48:	Einfluss auf die Phagozytoseaktivität durch Disorazol A	Seite 72
Abb. 49:	Einfluss auf die Phagozytoseaktivität durch Epothilon B	Seite 73
Abb. 50:	Einfluss auf die Phagozytoseaktivität durch Tubulysin A	Seite 74
Abb. 51:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Phagozytose nach 30 Minuten ohne Stimulation	Seite 75
Abb. 52:	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme der Phagozytose nach 60 Minuten ohne Stimulation	Seite 76
Abb. 53:	Zweidimensionales Gel der MeOH behandelten Zellen	Seite 77
Abb. 54:	Zweidimensionales Gel von Interferon γ behandelten Zellen	Seite 78
Abb. 55:	Zweidimensionales Gel der Purvalanol B behandelten Zellen	Seite 79
Abb. 56:	Zellen der Zelllinie RAW 264.7	Seite 83
Abb. 57:	Typische Wachstumskurve einer Zelllinie	Seite 84
Abb. 58:	Phagosomenreifung und TLR Signalweg	Seite 89
Abb. 59:	Schematische Darstellung der Verknüpfung der einzelnen Methoden	Seite 93

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Übersicht über die Funktionen der Makrophagen	Seite 9
Tabelle 2 :	Protokolle für TNF- α ELISAs	Seite 38
Tabelle 3	:Protokolle für die IL-6 ELISAs	Seite 39
Tabelle 4:	Einstellungen zu isoelektrischen Fokussierung	Seite 45
Tabelle 5:	Proteinmenge pro Zelle an den verschiedenen Versuchstagen	Seite 49
Tabelle 6:	Endkonzentrationen der verwendeten Substanzen	Seite 56
Tabelle 7:	Nitritkonzentration nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen	Seite 58
Tabelle 8:	Konzentration des Tumor-Nekrose-Faktors α nach Stimulation mit verschiedenen Substanzen	Seite 64
Tabelle 9:	Konzentrationen des Interleukin 6 nach Inkubation mit verschiedenen Substanzen	Seite 69

11. Abkürzungsverzeichnis

µL	Mikroliter
2D	zweidimensional
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinder Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CFSE	Carboxyl-Fluorescein-Diacetat- Succinimydil-Ester
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF	Dimethylformamid
DTT	1,4-Dithio-DL-threitol
ELISA	Ezyme linked immunosorbent assay
eNOS	endogene Stickstoffmonoxidsynthase
ERK	extrazellulär-regulierte Kinase
EtOH	Ethanol
FBS	fötales Rinderserum
g	Gramm
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettichperoxidase
IC ₅₀	halbmaximale Hemmkonzentration
IEF	isoelektrische Fokussierung
IFN-γ	Interferon γ
IL-10	Interleukin 10
IL-6	Interleukin 6
IMAC	immobilisierte Metallaffinitätschromatografie
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase

IR	Interleukin Rezeptor
IκB	Inhibitor des NF-κB
JNK	c-Jun-N-terminale- Kinase
Kap.	Kapitel
kDA	KiloDalton
L	Liter
LBP	LPS bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MIP-1	Macrophage inflammatory protein
mL	Milliliter
mm	Millimeter
NaAc	Natriumacetat
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
ng	Nanogramm
NIK	NF-κB inducing Kinase
NLS	Nukleäres Lokalisations-Signal
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
PAMPs	Pathogen assoziierte molekulare Muster
PBS	Phosphate buffered saline
pg	Picogramm
pI	Isoelektrischer Punkt
RFU	relative Fluoreszenzeinheiten
Rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGS	Tris-Glycin-SDS
TLR	Toll-like Rezeptor

TLR-4	Toll-like Rezeptor 4
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
U/min	Umdrehungen pro Minute
Vh	Voltstunden
WST	water soluble tetrazolium salt
z.B.	zum Beispiel

12. Literaturverzeichnis

- [1] Janeway, Ch. Travers, P.
„Immunologie“
Spektrum Verlag 2002, 5.Auflage
- [2] Roempp online Lexikon,
Thieme Verlag <http://www.roempp.com>
- [3] Staines, N. Brostoff, J. James, K.
„Immunologisches Grundwissen“
Gustav Fischer Verlag 1997, 3.Auflage
- [4] Medzhitov, R.
„Toll-like Receptors and innate immunity“
Nature Reviews Immunology 2001, Vol. 1, S.435-445
- [5] Kemeny, D.M.
„ELISA- Enzyme linked immunosorbent Assay im biologisch/medizinischen Labor“
Gustav Fischer Verlag, 1994
- [6] Luttmann, W. Bradtke, K. Küpper, M. Myrtek, D.
„Der Experimentator – Immunologie“
Spektrum Verlag 2004, 1.Auflage
- [7] Schinzer, D. Limberg, A.
„Epothilone: neue Wirkstoffe gegen Krebs“
Magdeburger Wissenschaftsjournal 1/2000, S.23-29
- [8] Reichenbach, H. Gerth, K. Irschik, H. Kunze, B. Höfle, G.
„Myxobacteria: a source of new antibiotics“
TIBTECH 1988, Vol. 6, S.115-121
- [9] Karlson, P.
„Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler“ Georg Thieme
Verlag Stuttgart, 13.Auflage, 1988
- [10] Irschik, H. Jansen, R. Gerth, K. Höfle, G. Reichenbach, H.
„Disorazol A, an efficient Inhibitor of eukaryotic organisms isolated from Myxobacteria“ ,
The Journal of Antibiotics 1995, Vol. 48, No.1, S.31-35
- [11] Gerth, K. Bedorf, N. Höfle, G. Irschik, H. Reichenbach, H.
„Epothilon A and B: Antifungal and cytotoxic compounds from *Sorangium cellulosum*
(Myxobacteria) Production, Physico-chemical and biological properties“
The Journal of Antibiotics 1996, Vol. 49, No.6, S.560-563

[12] Bollag, D.M. et al.

„Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action“

Cancer Research 1995, Vol. 55, S.2325-2333

[13] Jansen, R. Irschik, H. Reichenbach, H. Wray, V. Höfle, G.

„Disorazoles, highly cytotoxic metabolites from the Sorangicin-producing bacterium *Sorangium cellulosum*, strain Soce12“

Liebigs Annalen der Chemie 1994, S.759-773

[14] Wehner, R. Gehring, W.

„Zoologie“ Thieme Verlag, 23.Auflage, 1995

[15] Aderem, A. Underhill, D.M.

„Mechanismus of phagocytosis in macrophages“

Annual Reviews of Immunology 1999, Vol. 17, S. 593- 623

[16] O'Neill, L.A.J.

„How Toll-like receptors signal: what we know and what we don't know“

Current opinion in Immunology 2006, Vol. 18, S.3-9

[17] Covert, M.W. et al.

„Achieving stability of Lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation“

Science 2005, Vol. 309, S.1854-1857

[18] May, M. J. Ghosh, S.

„Signal transduction through NF- κ B“

Immunology today review 1998, Vol. 19, No.2, S.80-88

[19] Gregory, C.D. Devitt, A.

„The macrophage and the apoptotic cell: an innate immune interaction viewed simplistically?“

Immunology 2004, Vol. 113, S.1-14

[20] Aderem, A.

„How to eat something bigger than your head“

Cell 2002, Vol. 110, S.5-8

[21] Perkins, N.D.

„The Rel/NF- κ B family: friend and foe“

TIBS 2000, Vol. 25, S.434-440

[22] Gilmore, T.D.

„The Rel/NF- κ B signal transduction pathway: introduction“

- Oncogene 1999, Vol. 18, S.842-6844
- [23] Medzhitov, R. Janeway, C.A. Jr.
„Innate immunity: The virtues of a nonclonal system of recognition”
Cell 1997, Vol. 91, S. 295-298
- [24] Bachmann, M.F. Kopf, M. Marsland, B.J.
„Chemokines: more than just roadsigns“
Nature Reviews Immunology 2006, Vol. 6, S.159- 164
- [25] Stancovski, I. Baltimore, D.
„NF- κ B activation: The I κ B kinase revealed?”
Cell 1997, Vol. 91, S.299-302
- [26] Vivier, E. Malissen, B.
„Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited”
Nature Immunology 2005, Vol. 6, No.1, S.17-21
- [27] Janeway, C.A.Jr. Medzhitov, R.
„Innate immune recognition“
Annual Reviews of Immunology 2002, Vol. 20, S.197-216
- [28] Akira, S. Takeda, K.
„Toll like receptor signalling“
Nature reviews immunology 2004, Vol. 4, S.499-511
- [29] Campbell, N.A.
„Biologie“
Spektrum Verlag 1997, 1.Auflage
- [30] <http://www.biology.arizona.edu/immunology/tutorials/immunology/02t.html>
- [31] <http://www.novascreen.com/images/toll.jpg>
- [32] <http://lipidbank.jp/image/CLS0611.gif>
- [33] <http://www.cartage.org.lb/en/themes/Sciences/LifeScience/GeneralBiology/Immunology/Recognition/AntigenRecognition/Antibodystructure/ab12.gif>
- [34] Koolman, J. Röhm, K.-H.
„Taschenatlas der Biochemie“
Thieme Verlag 1994, 1.Auflage
- [35] <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/255/255hist/mcb5.20a.phagy.jpg>
- [36] http://www.limmatsharks.com/images/svl_imm_figur1.gif
- [37] Hakim, T.S. et al.
„Half-life of nitric oxide in aqueous solutions with and without haemoglobin”

Physiological Measurement 1996, Vol. 17, S.267-277

[38] <http://www.promega.com/tbs/tb229/tb229.pdf>

[39] <http://probes.invitrogen.com/lit/catalog/3/images/g001698.gif>

[40] <http://www.gbichina.com/grafts/compan2.jpg>

[41] Hänsch, G.M.

“Einführung in die Immunbiologie”

Gustav Fischer Verlag 1986, 1.Auflage

[42] <http://www.sciencemag.org/feature/e-market/prodlink/bioradcuploading.jpg>

[43] <http://www.biorad.com>

[44] <http://yatil.de/chemie/images/peptidbindung.gif>

[45] <http://www.zytologie-online.net/images/zytoskellet.jpg>

[46] <http://www.dojindo.com/products/alphasearch/dojindodtl1.cfm?alphafield=WST-1>

[47] Hagiwara, S. et al.

„Changes in cell culture Temperature alter release of inflammatory mediators in Murine macrophage RAW 264.7 cells“

Inflammatory Research 2007, Vol. 56, S.297-303

[48] Stuehr, D.J. Marletta, M.A.

„Synthesis of nitrite and nitrate in murine Macrophage cell lines“

Cancer Research 1987, Vol. 47, S.5590-5594

[49] <http://www.lgcpromochem.atcc.com/common/catalog/numSearch/numResults.cfm?atccNum=TIB-71>

[50] http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/images/Cells/TIB-71_mg1.jpg

[51] Vetcher, L. et al.

„The antifungal Polyketide Ambruticin targets the HOG Pathway“

Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2007, Vol. 51, S.3734-3736

[52] Piel, J. et al.

„Exploring the Chemistry of uncultivated bacterial symbionts: antitumor polyketides of the Pederin family“

Journal of natural products 2005, Vol. 68, S.472-479

[53] Schroeder, C. I. Lewis, R. J.

„ ω -Conotoxins GVIA, MVIIA and CVID: SAR and Clinical Potentials“

Marine Drugs 2006, Vol. 4, S. 193-214

[54] Gerth, K. Et al.

„ Myxothiazol, an antibiotic from *Myxococcus fulvus*“

The Journal of Antibiotics 1980, Vol. 33, S.1474-1479

[55] Zhu, X. et al.

„ Lipopolysaccharide primes macrophages to increase nitric oxide production in response to *Staphylococcus aureus*“

Immunology Letters 2007, Vol. 112, S. 75-81

[56] Delom, F. Chevet, E.

„ Phosphoprotein analysis: from proteins to proteomes“

Proteome science 2006, Vol. 4, S.

[57] http://www.expasy.org/swiss-2dpage/ac=ACTB_MOUSE

[58] An, S. J. et al.

„ Inhibition of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 productions and NF- κ B activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae)“

International Immunopharmacology 2002, Vol. 2, S. 1173-1181

[59] Park, J.-S. et al.

„ Anti-inflammatory effects of short chain fatty acids in IFN- γ -stimulated RAW 264.7 murine macrophage cells: Involvement of NF- κ B and ERK signalling“

International Immunopharmacology 2007, Vol. 7, S.70-77

[60] Hassan, F. et al.

„ Role of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) for vacuole formation in Lipopolysaccharide (LPS)-stimulated macrophages“

Microbial Immunology 2004, Vol. 48, S. 807-815

[61] Ishihara, K. Hirano, T.

„IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease“

Cytokine & Growth Factor Reviews 2002, Vol. 13, S. 357-368

[62] <http://www.ethlife.ethz.ch/articles/tages/epothilon.html>

[63] Le Page, C. et al.

„Differential expression of inducible NO synthase in two murine macrophage cell lines“

Immunology 1996, Vol. 89, S. 274-280

[64] Schummer, D. et al.

„Vioprolides: new antifungal and cytotoxic peptolides from *Cystobacter violaceus*“

Liebigs Annalen der Chemie 1996, S.971-978

[65] Kopp, M. et al.

„Production of the tubulin destabilizer Disorazol in *Sorangium cellulosum*: Biosynthetic machinery and regulatory genes“

ChemBioChem 2005, Vol. 6, S. 1277-1286

[66] Duffield, J.S.

„The inflammatory macrophage: a Story of Jekyll and Hyde“

Clinical science 2003, Vol. 104, S. 27-38

[67] <http://de.wikipedia.org>

[68] <http://www.internetchemie.info/news/2007/nov07/epothilone.html>

[69] Watts, C.

„The Bell Toll for Phagosome Maturation“

Immunology 2004, Vol. 304, S.976-977

[70] http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/wildbrett-peer-2003-07-14/HTML/Wildbrett_html_m3047064.gif

[71] Elnakady, Y.A. et al.

„Disorazol A1, a highly effective antimetabolic agent acting on tubulin polymerisation and inducing apoptosis in mammalian cells“

Biochemical Pharmacology 2004, Vol. 67, S.927-935

[72] http://www.tocris.com/products/Purvalanol_B.php

[73] Knockhaert, M. et al.

„p42/p44 MAPKs are intracellular targets of the CDK inhibitor Purvalanol“

Oncogene 2002, Vol. 21, S.6413-6424

[74] Liew, F.Y et al.

„ Negative regulation of Toll-like receptor-mediated immune responses“

Nature reviews 2005, Vol. 5, S. 446-458

[75] May, R.C. Machesky, L.M.

„ Phagocytosis and the actin cytoskeleton“

Journal of cell science 2001, Vol. 114, S.1061-1077

[76] Chow, J.C. et al.

„ Toll-like Receptor-4 Mediates Lipopolysaccharide-induced Signal Transduction“

The Journal of Biological Chemistry 1999, Vol. 274, S.10689-10692